

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
(Direktor: Prof. Dr. med. T. Schwarz)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Untersuchung zur Rolle der Profilaggrin-Peptide FLG₁₇₆₋₂₀₇,
FLG₁₆₂₋₁₈₄ und FLG₁₆₂₋₂₀₇ in der kutanen Abwehr**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Kristin Garske
aus Neuruppin

Kiel 2015

Referent: Prof. Dr. rer. nat. J.-M. Schröder, Klinik für Dermatologie, Venerologie und
Allergologie

Korreferent: Prof. Dr. J. Grötzinger, Biochemisches Institut

Tag der mündlichen Prüfung: 05.09.2016

zur Auslage frei: Kiel, den 30.06.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Aufbau der Haut	2
1.2 Abwehrmechanismen der Haut.....	5
1.3 Antimikrobielle Peptide.....	6
1.4 Epidermaler Differenzierungskomplex und S100-Proteine.....	8
1.5 Filaggrin.....	9
1.6 Zielsetzung der Arbeit	11
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Chemikalien.....	13
2.2 Vektoren.....	13
2.3 Oligonukleotide.....	14
2.4 Enzyme.....	14
2.5 Puffer und Lösungen.....	15
2.6 Nährmedien.....	16
2.7 Kits.....	17
2.8 Einwegmaterial.....	18
2.9 Geräte.....	18
2.10 Mikroorganismen.....	21
2.11 Molekularbiologische Methoden.....	21
2.11.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	21
2.11.1.1 Standard-PCR.....	22
2.11.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	24
2.11.3 Gel-Extraktion.....	25
2.11.4 Ligation.....	25
2.11.5 Transformation.....	26
2.11.6 Isolierung von Plasmid-DNA.....	27
2.11.7 Restriktionshydrolyse.....	28
2.11.8 DNA-Sequenzierung.....	29
2.12 Rekombinante Expression in Escherichia coli	30
2.12.1 Struktur des Expressionsvektors.....	30
2.12.2 Durchführung der Herstellung des Fusionsproteins.....	32
2.13 Aufreinigung der Profilaggrin-Fragmente.....	33
2.13.1 Aufschluss der Expressionskultur.....	33
2.13.2 immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie.....	33

2.13.2	Größenausschlusschromatographie.....	34
2.13.3	Spaltung der Fusionsproteine mit Bromcyan.....	34
2.13.4	C18-Umkehrphasen-HPLC.....	35
2.13.5	Präparation des Peptidfragments FLG162-184.....	37
2.14	Proteinanalytik.....	37
2.14.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	37
2.14.2	Massenspektrometrie.....	38
2.15	Antimikrobielle Testverfahren.....	39
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Amplifizierung der Profilaggrin-Fragmente.....	41
3.2	Klonierung im pJet1.2-Vektorsystem.....	42
3.3	Klonierung im pE-SUMO3-Vektorsystem.....	45
3.3.1	Ligation und Transformation in E. coli XL1-Blue-Zellen.....	45
3.3.2	Transformation in E. coli BL21(DE3)pLysS-Zellen.....	45
3.4	Expression der Fusionsproteine.....	46
3.5	Aufreinigung der Fusionsproteine.....	46
3.6	Aufreinigung der rekombinanten Profilaggrin-Fragmente.....	48
3.6.1	Aufreinigung der Fusionsproteine pE-SUMO3-FLG162-207 und -FLG176-207.....	48
3.6.2	Präparation des Peptidfragments FLG162-184.....	50
3.7	Antimikrobielle Testung der Profilaggrin-Fragmente FLG162-207, FLG162-184 und FLG176-207.....	52
4	Diskussion.....	53
5	Zusammenfassung.....	63
6	Anhang.....	64
6.1	Vektorkarten.....	64
6.2	Peptidfragmente.....	64
6.2.1	FLG162-207.....	64
6.2.2	FLG176-207.....	65
6.2.3	FLG162-184.....	65
6.3	bisher getestete Profilaggrin-Teilfragmente.....	65
7	Literaturverzeichnis.....	66
8	Danksagung.....	73
9	Lebenslauf.....	74
10	Erklärung.....	75

Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
Abb.	Abbildung
ATCC	„American Type Culture Collection“
AU	„area under the curve“ (Fläche unter der Kurve)/ „absorption unit“ (Absorptionseinheit)
β	Beta
bp	Basenpaare
<i>Bsa</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
ca.	circa
Ca^{2+}	Calcium
cm	Zentimeter
Da	Dalton
DNA	„Desoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FLG	Filaggrin
h	Stunden
HPLC	„High Performance Liquid Chromatography“ (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kDa	Kilodalton
LB	„Lysogenic Broth“ (lysogene Bouillon)
M	molar
m^2	Quadratmeter
MEK	Minimale Effektive Konzentration
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD_{600}	Optische Dichte bei 600 nm
PBS	„Phosphate-Buffered Saline“ (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFLG	Profilaggrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- Aktivität
RNA	„Ribonucleic acid“ (Ribonukleinsäure)
rpm	„revolutions per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TFA	„Trifluoric acid“ (Trifluoressigsäure)
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TSB	„Tryptic Soy Broth“ (tryptische Soja-Bouillon)
U	„units“ (Einheiten)
UV	Ultraviolett

Xba
x g
μg
μl
μm
ω
z.B.
Zn²⁺

Xanthomonas badrii
Erdbeschleunigung
Mikrogramm
Mikroliter
Mikrometer
Omega
zum Beispiel
Zink

1 Einleitung

Die Entdeckung des Penicillins vor 85 Jahren kann als einer der größten Erfolge der modernen Medizin angesehen werden. Es wurde von Alexander Fleming zufällig in einer Bakterienkultur entdeckt, in der der Schimmelpilz *Penicillium notatum* wuchs und Bakterienabtötende Eigenschaften zeigte. Weitere natürlich vorkommende Penicilline wurden erforscht und in späteren Jahren auch durch synthetisch hergestellte Antibiotika ergänzt. Durch die Entdeckung des Penicillins konnten seither unzählige Menschenleben gerettet werden. Mit der Zeit wurde allerdings beobachtet, dass sich immer mehr Resistenzen gegen die jahrzehntelang eingesetzten Antibiotika entwickelten. Mittlerweile gibt es zahlreiche multiresistente Keime, die immer schwerer zu behandeln sind, da sich die herkömmlichen Antibiotika wirkungslos gegen sie zeigen. Mit Weiterentwicklungen von Antibiotika, die gezielt gegen bestimmte resistente Bakterien wirken, konnten bislang einige Erfolge erzielt werden, jedoch ist nicht auszuschließen, dass sich weitere Resistenzen entwickeln werden.

Aus diesem Grund begeben sich Forscher auf die Suche nach Alternativen zu den herkömmlichen Antibiotika. Hierbei fiel das Augenmerk auf die sogenannten antimikrobiellen Peptide, welche als Mitglieder des angeborenen Immunsystems zahlreiche Funktionen inne haben. Zum einen schützen sie vor Mikroorganismen und mikrobiellen Substanzen und wirken wie körpereigene Antibiotika. Des Weiteren gibt es Peptide, die fungizid oder antiviral wirken, wie beispielsweise die Defensine (Ganz *et al.*, 1985), sowie solche die chemotaktische Eigenschaften besitzen und dadurch eine Verbindung zum erworbenen Immunsystem darstellen (Territo *et al.*, 1989, Übersicht in Harder *et al.*, 2007). Zunächst waren viele dieser Peptide nur bei Pflanzen oder auch in verschiedenen Organsystemen von Wirbeltieren bekannt, wie beispielsweise das Cryptidin der Paneth Zellen des Darms (Ouellette *et al.*, 1992). Jedoch isolierte M. Zasloff 1987 aus der Haut des afrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) das antimikrobielle Peptid Magainin und bewies damit, dass antimikrobielle Peptide nicht nur im Körperinneren vorhanden sind, sondern auch in der Haut vorkommen (Zasloff, 1987). Somit lag die Vermutung nahe, dass auch Menschen über solche dermalen antimikrobiellen Peptide verfügen könnten und zu ihrer eigenen Abwehr nutzen. Die antimikrobiellen Peptide sind in den Fokus vieler Forschungsreihen gerückt, mit der Hoffnung, Erkenntnisse über ihre Wirkungsweise zu erlangen und sie in Zukunft eventuell als Therapeutika einsetzen zu können. Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit den antimikrobiellen Peptiden der Haut. Im folgenden soll zunächst der Aufbau der Haut, sowie Allgemeines zu den antimikrobiellen Peptiden beschrieben werden.

1.1 Aufbau der Haut

Die Haut ist mit ihrer Fläche von knapp 2 m² eines der größten Organe des menschlichen Körpers (Lüllmann-Rauch, 2006). Sie wird in mehrere Schichten eingeteilt und hat zahlreiche Funktionen inne. Sie wird unterteilt in die äußere Kutis (Haut), und die darunter liegende Subkutis (Unterhaut). Die Kutis wiederum setzt sich zusammen aus der Epidermis (Oberhaut) und der bindegewebigen Dermis (Lederhaut).

Die der Umwelt unmittelbar ausgesetzte Epidermis ist ein mehrschichtig verhorntes Plattenepithel, bestehend aus Keratinozyten und der sie umgebenden extrazellulären Matrix. Außerdem sind hier auch in geringerem Maße die Pigment-bildenden Melanozyten, die dem Immunsystem angehörenden Langerhans-Zellen und Zellen der Oberflächensensibilität (z.B. Merkel-Zellen) zu finden. Die Epidermis gliedert sich in vier Zellschichten mit einer oder mehreren Lagen von Zellen (siehe Abb. 1.1).

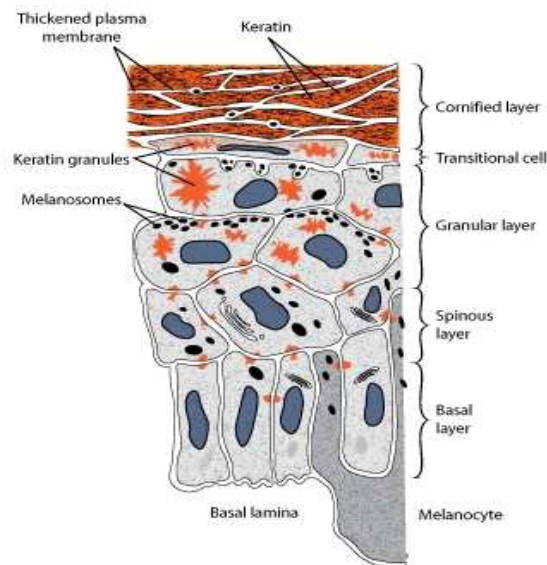


Abb. 1.1: Aufbau der Epidermis

Die unterste Zellschicht der Epidermis ist das proliferative *Stratum basale*, welches der Basallamina aufliegt. Darüber befindet sich das *Stratum spinosum*, in welchem die Keratinozyten aus dem Zellzyklus austreten und die Umwandlung des Zytoskelettes beginnt. Darauf folgen die Zellschichten des *Stratum granulosum* mit ihren Keratohyalin granula. Als äußerste Schicht findet man das *Stratum corneum* und seine miteinander vernetzten, nun kernlosen Korneozyten. Auch die Übergangszone (oder auch Transitionszone) in der die Keratinozyten ihre Kerne verlieren ist markiert. Des weiteren ist ein Melanozyt im *Stratum basale* und dessen Produkte, die Melanosomen (Pigmentkörperchen) gezeigt.

(Quelle: <http://www.sciencelearn.org.nz/Contexts/You-Me-and-UV/Sci-Media/Images/Layers-of-the-epidermis>)

Es findet eine ständige Zellwanderung von der tiefsten in die oberste Schicht statt. Hierbei kommt es zur Differenzierung der Keratinozyten in kernlose Korneozyten (Hornzellen) und zur Ausbildung des „Cornified Cell Envelope“. Die unterste Schicht, welche direkt der Basallamina aufsitzt, besteht aus einer Reihe prismatischer epithelialer Stammzellen, die für den kontinuierlichen Zellnachschub sorgen. Des Weiteren findet man hier Sinneszellen und die farbgebenden Melanozyten. In der gesunden Haut finden nur im *Stratum basale* Mitosen statt. Junge Keratinozyten, die aus dem *Stratum basale* hervorgehen gehen in das zwei bis fünf Lagen umfassende *Stratum spinosum* über, verlieren ihre mitotische Aktivität und beginnen die Differenzierung (Lüllmann-Rauch, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass Ca^{2+} während der Differenzierung der Keratinozyten eine wichtige Rolle spielt. So fanden Menon *et al.* vom *Stratum basale* bis hin zum *Stratum corneum* ansteigende intrazelluläre Calciumkonzentrationen in der Epidermis (Menon *et al.*, 1985). In einer Studie von Smith *et al.* konnte gezeigt werden, dass die Exposition von Keratinozyten mit aktiviertem Vitamin D3 (Calcitriol), welches für eine erhöhte Resorption von Ca^{2+} aus dem Darm und der Niere zuständig ist, eine Dosis-abhängige Verminderung der Proliferation und eine Steigerung der Differenzierung dieser Zellen hervorruft (Smith *et al.*, 1986).

Während nun die intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel steigen, werden vermehrt Envoplakin, Periplakin und Involucrin exprimiert (Kalinin *et al.*, 2001), welche durch die Transglutaminase 1 miteinander, sowie mit Membranbestandteilen und Desmosomen vernetzt werden. Dadurch entsteht eine monomolekulare Schicht an der zytosolischen Seite der Plasmamembran.

In dem darauf folgenden drei bis fünflagigen *Stratum granulosum* bilden sich erstmals sogenannte Keratohyalin granula in den Keratinozyten aus, die Loricrin (L-Granula) und Profilaggrin (F-Granula) enthalten (Steven *et al.*, 1990). Loricrin wird, nach seiner Freisetzung aus den Keratohyalin granula, in die Proteinmatrix des „Cornified Cell Envelope“ eingearbeitet. Das Profilaggrin wird hingegen proteolytisch in Filaggrin-Monomere gespalten, welche in der Lage sind, an Keratinfilamente zu binden und sie zu dichten Bündeln zu aggregieren (Steinert *et al.*, 1981).

Aus dem Golgi-Apparat werden Lamellarkörperchen freigesetzt, die ω -Hydroxy-Ceramide, langkettige Fettsäuren und Cholesterol enthalten. Diese verschmelzen mit der Plasmamembran, sodass die Lipide in den extrazellulären Raum gelangen (Kalinin *et al.*, 2001). Durch all diese Schritte kommt es letztendlich zum Umbau der Zellmembranen und der Entstehung des „Cornified Cell Envelope“ mit einer quervernetzten Proteinmatrix auf der zytosolischen und einer Lipidmatrix auf der extrazellulären Seite.

Im *Stratum corneum* sterben die Keratinozyten ab und verlieren ihren Kern und sämtliche

Zellorganellen. Der genaue Mechanismus dieses programmierten Zelltods ist noch nicht bekannt. Er unterscheidet sich von der Apoptose anderer Zellen in mehreren Faktoren (Lippens *et al.*, 2005). Die Rolle der Caspase-14, welche fast ausschließlich in der Epidermis zu finden ist, wird jedoch diskutiert, da sie während der epidermalen Differenzierung in den Keratinozyten aktiviert wird. Jedoch konnten bislang keine apoptotischen Eigenschaften nachgewiesen werden (Lippens *et al.*, 2005). Fortan heißen die in flachen parallelen Reihen angeordneten Zellen Korneozyten. Die Zellen erhalten durch die Kompaktierung und Bündelung der Keratinfilamente durch die Filaggrin-Monomere eine abgeflachte Form, welche charakteristisch für die Korneozyten der letztendlich entstandenen Hornschicht ist. Sie bestehen nun hauptsächlich aus aggregierten Keratinfilamenten in einer Filaggrinmatrix, umgeben von unlöslichen Lipiden (Candi *et al.*, 2005). Die Hornzellen werden mit der Zeit, während permanent neue Hornzellen nachrücken, von der Oberfläche abgeschilfert (Desquamation). Hierbei spielt die Degradation der Corneodesmosomen (modifizierte Desmosomen des Stratum corneum) eine Rolle (Chapman und Walsh, 1990). Es findet ein andauernder Kreislauf aus Zellproliferation, Differenzierung und Zelltod statt. Dieser Prozess dauert, vom neu entstandenen jungen Keratinozyten bis hin zum abgeschilfertem Korneozyten, in der menschlichen Haut ca. vier Wochen (Lüllmann-Rauch, 2006).

Die darunter liegende Dermis gibt der Haut, aufgrund ihrer Mischung aus lockerem und straffem Bindegewebe, sowie begleitenden elastischen Fasern, eine besondere Widerstandsfähigkeit und Dehnbarkeit. Hier sind die terminalen Blutgefäße zu finden, während die Epidermis gefäßfrei bleibt. Die Gefäßplexus der Dermis dienen ihrer Blutversorgung, sowie der Thermoregulation. Darüber hinaus finden sich zahlreiche Zellen der Abwehr in der Dermis, sowie freie Nervenendigungen, die unter anderem Schmerz- und Juckempfindungen übermitteln.

Die Subkutis besteht aus lockerem Binde- und Fettgewebe und wird durchzogen von Nerven, Lymph- und Blutgefäßen. Sie dient als Druckpolster und als Verschiebeschicht. Außerdem dient sie der Wärmeisolation und als Energiespeicher.

In der Dermis und Subkutis finden sich zudem Proteoglykane und Hyalurone, welche Wasser-bindende Eigenschaften besitzen und die Hautdecke damit zu einem wichtigen Wasserspeicher machen (Lüllmann-Rauch, 2006). Auch das Filaggrin ist an der Hydratation der Haut beteiligt. Nachdem es in Filaggrin-Monomere gespalten wurde und seine Wirkung auf die Kompaktierung der Keratinfilamente entfalten konnte, folgt im *Stratum corneum* die weitere Proteolyse in hydrophile Aminosäure-Derivate wie z.B. Pyrrolidoncarbonsäure oder Urocaninsäure. Diese wirken als „Natural moisturizing Factor“ der Haut und spielen eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung ihrer Hydratation (Kezic *et al.*, 2008).

1.2 Abwehrmechanismen der Haut

Die zahlreichen Funktionen der Haut lassen sich von ihrem Aufbau ableiten, wie beispielsweise die sehr wichtige Barrierefunktion die sie für den Körper einnimmt. Der Mensch ist tagtäglich einer großen Anzahl von potentiell pathogenen Keimen und anderen schädlichen Stoffen ausgesetzt, welche trotzdem nur selten zu Infektionen der Haut führen (Schröder und Harder, 2006). Betrachtet man nun den speziellen Aufbau der Haut, erklärt sich dies mit dem Zusammenspiel aus einer physikalischen und chemischen Barriere.

Die physikalische Barriere der Haut ist auf den Aufbau des *Stratum corneum* zurückzuführen. Die miteinander vernetzten Korneozyten ergeben, eingebettet in wasserunlösliche Lipide, die starke Schutzschicht der Körperoberfläche. Sie verhindert den Wasserverlust über die Haut und das Eindringen von Allergenen und infektiösen Organismen (Candi *et al.*, 2005). Außerdem spielen die Abbauprodukte des Filaggrins eine besondere Rolle in der Hydratation der Haut. Ein Wassermangel würde zu einer gestörten Funktion der sich in der Haut befindenden Proteasen und im Zuge dessen auch der Proteine führen (Kezic *et al.*, 2012). Dies würde Krankheiten hervorrufen, die aus der Störung dieser Proteine resultieren (Candi *et al.*, 2005).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der pH der Haut das Wachstum von Bakterien beeinflussen kann. Die gesunde Haut verfügt über ein saures Milieu (pH ca. 4,5-5,0), welches beispielsweise das Wachstum von *Staphylococcus aureus* behindert (Miajlovic *et al.*, 2010).

Die kontinuierliche Abschilferung der Hornzellen des *Stratum corneum* trägt zu einer ständigen Erneuerung der Hautbarriere bei und sorgt zudem dafür, dass es Mikroorganismen erschwert wird, an der Oberfläche der menschlichen Haut zu binden.

Die chemische Barriere der Haut setzt sich aus verschiedenen Proteinen und Lipiden zusammen, welche Abwehrmechanismen gegen vielfältige Erreger bieten und die Haut dadurch vor der Besiedelung mit diesen Keimen, bzw. deren Eindringen schützen (Harder *et al.*, 1997, Gläser *et al.*, 2005, Drake *et al.*, 2008).

Der Verteidigung gegen pathogene Keime dient natürlich auch das Immunsystem. Es setzt sich bei Wirbeltieren aus dem angeborenen, unspezifischen und dem erworbenen, spezifischen Immunsystem zusammen, im Gegensatz zu Wirbellosen, welche lediglich über ein unspezifisches Immunsystem verfügen. Die unspezifische Abwehr wird auf zellulärer Ebene durch phagozytierende Granulozyten und Makrophagen, sowie natürlichen Killerzellen repräsentiert. Es ist von Geburt an funktionstüchtig und kann innerhalb kürzester Zeit auf potentiell schädigende Einflüsse reagieren. Außerdem werden auch das Komplementsystem, Zytokine, sowie antimikrobielle Peptide zu diesem System gezählt.

Das erworbene Immunsystem ist langsamer als das angeborene, jedoch auch um ein Vielfaches effektiver, da es aus der zellulären Abwehr der T-Lymphozyten und der humoralen Abwehr der B-Lymphozyten besteht, welche nach Kontakt mit T-Zellen innerhalb von vier bis fünf Tagen zu Plasmazellen ausdifferenzieren, die hochspezifische Antikörper produzieren (Janeway, 2001). Zudem zählen auch professionelle Antigen-präsentierende-Zellen und Makrophagen zu diesem System. Die T-Helferzellen sezernieren Zytokine, welche in viele Vorgänge der spezifischen und unspezifischen Abwehr eingreifen und interagieren mit anderen Zellen wie den B-Lymphozyten und Makrophagen. Die zytotoxischen T-Zellen töten infizierte, entartete und fremde Zellen durch die Sekretion von Perforinen und Granzymen.

Sowohl B-, als auch T-Lymphozyten sind in der Lage, Gedächtniszellen zu bilden, welche bei erneutem Kontakt mit demselben Antigen zu einer schnelleren und stärkeren Immunantwort fähig sind („immunologisches Gedächtnis“) (Lüllmann-Rauch, 2006).

Das Zusammenspiel all dieser verschiedenen Abwehrmechanismen macht die Haut zu einem sehr widerstandsfähigen Organ und zu einer wirkungsvollen Barriere des menschlichen Körpers.

1.3 Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide gehören zu einer großen und vielfältigen Gruppe von Molekülen, die durch verschiedene Gewebe und Zellarten in Wirbellosen, Pflanzen und Tieren produziert werden (Brogden, 2005). Es sind Oligo- bis Polypeptide, die einen hohen Anteil an basischen Aminosäuren besitzen und daher bei physiologischem pH meist kationisch vorliegen.

Mittlerweile sind über 800 antimikrobielle Peptide bei Tieren und Pflanzen bekannt (Boman, 2003).

Im Jahre 1987 fand der Forscher M. Zasloff in der Haut des afrikanischen Krallenfrosches das antimikrobielle Peptid Magainin (Zasloff, 1987). Diesem Fund folgten weitere Studien und Entdeckungen wichtiger Vertreter der antimikrobiellen Peptide der Haut.

Das humane β -Defensin-1 konnte 1995 in menschlichen Blutplasma-Proben nachgewiesen werden (Bensch *et al.*, 1995). Die Entdeckung der humanen β -Defensine-2 und -3 in psoriatischen Hautproben zeigte, dass auch die menschliche Haut in der Lage ist antimikrobielle Peptide zu produzieren (Harder *et al.*, 1997, Harder *et al.*, 2001) .

In humanen Granulozyten wurde 1997 das antimikrobielle Peptid LL-37 entdeckt (Frohm *et al.*, 1997) und im Jahr 2002 gelang es erstmals ein antimikrobielles Peptid aus gesunder Haut zu isolieren, die Rnase 7 (Harder und Schröder, 2002). Somit wurde bewiesen, dass es in der menschlichen Haut körpereigene antimikrobielle Stoffe gibt, die dazu beitragen, dass

es trotz der ständigen Besiedelung mit ca. 10^2 bis 10^7 Mikroorganismen pro cm^2 nur selten zu Infektionen kommt (Schröder und Harder, 2006).

Antimikrobielle Peptide lassen sich anhand ihrer Größe, Aminosäure-Sequenz und ihrer strukturellen Motive in Gruppen einteilen. Beim Menschen kommen antimikrobielle Peptide aus vier Familien vor: Defensine, Cathelicidine, Ribonukleasen und S100-Proteine (Harder *et al.*, 2007).

Als Hauptangriffsort der antimikrobiellen Peptide galt zunächst die Zellmembran von Mikroorganismen. Durch ihre kationische Ladung entsteht eine elektrostatische Anziehungskraft zu den negativ geladenen Bakterienmembranen, was in der Anlagerung an deren Oberfläche resultiert. Es existieren verschiedenen Modelle, wie antimikrobielle Peptide in die Bakterienmembranen eintauchen und dort Poren bilden. Dadurch wird das Membranpotential und folglich auch die Bakterien zerstört (Kagan *et al.*, 1990). Doch auch andere Mechanismen sind mittlerweile bekannt, wie beispielsweise die Bindung von Metall-Ionen. Bakterien besitzen, ebenso wie auch viele Eukaryoten, eine Cu^{2+} -/ Zn^{2+} -Superoxiddismutase, welche die Bakterien vor oxidativem Stress schützt. Es konnte gezeigt werden, dass Psoriasin an Zn^{2+} -Ionen bindet und dieses den Bakterien somit entzieht (Gläser *et al.*, 2005), wodurch die Bakterien nicht mehr in der Lage sind, sich gegen oxidativen Stress zu wehren.

Jedes antimikrobielle Peptid hat ein spezielles Wirkspektrum gegen bestimmte Erreger und liegt entweder in intrazellulären Speichern vor oder dessen Produktion wird durch bestimmte Mediatoren induziert. Am humanen β -Defensin-2 konnte erstmals gezeigt werden, dass ein menschliches β -Defensin durch Kontakt mit Mikroorganismen induzierbar ist (Harder *et al.*, 1997). Nachfolgend fand man heraus, dass viele Peptide mit antimikrobieller Aktivität nach Kontakt mit Mikroorganismen oder mikrobiellen Produkten verstärkt exprimiert werden (Harder und Schröder, 2005).

Manche antimikrobiellen Peptide werden in gesunder Haut permanent produziert wie das Lysozym oder die Rnase 7 (Harder und Schröder, 2002). Andere Peptide werden wiederum nur produziert, wenn sie durch inflammatorische Mechanismen induziert wurden. Ein Beispiel hierfür ist das Cathelicidin LL-37, welches nur in geschädigter Haut, wie bei Psoriasis oder allergischen Reaktionen vorkommt (Frohm *et al.*, 1997). Während inflammatorischer Prozesse können antimikrobielle Peptide durch Zytokine wie IL1, TNF- α oder auch INF- γ induziert werden (Harder und Schröder, 2005), sowie während der Wundheilung durch die Wachstumsfaktoren IGF-1 und TGF- α (Sorensen *et al.*, 2003).

1.4 Epidermaler Differenzierungskomplex und S100-Proteine

Genfamilien strukturell oder funktionell ähnlicher Moleküle finden sich in Genomen oft in Clustern angeordnet. Ein solches Gencluster stellt der 1,9 Mbp große „epidermale Differenzierungskomplex“ (1q21) auf Chromosom 1 dar. In diesem Komplex finden sich die Gene von zahlreichen Proteinen, die an der epidermalen Differenzierung beteiligt sind. Sie werden in vier Genfamilien eingeteilt: die „Cornified Envelope Precursor“-Proteine, die S100-Calcium-bindenden Proteine, die „Late Cornified Envelope“-Proteine und die „S100 Fused Type“-Proteine (Mischke *et al.*, 1996, Marshall *et al.*, 2001).

Die „S100 Fused Type“-Proteine sind Moleküle, die verschiedene Eigenschaften der „Cornified Envelope Precursor“-Proteine und der S100-Proteine in sich vereinen. So beinhalten sie zwei Calcium-bindende EF-Hand-Domänen ähnlich denen der S100-Proteine. Nachfolgend findet sich eine Tandem-repeat-Abfolge (Wiederholungen mehrerer Sequenzeinheiten) die charakteristisch für die „Cornified Envelope Precursor“-Proteine sind. Die „S100 Fused Type“-Proteine bestehen wie die S100-Proteine aus drei Exons und zwei Introns, wobei das erste und kleinste Exon nicht translatiert wird. Das zweite beinhaltet das Startcodon und die codierende Sequenz der ersten Calcium-bindenden Domäne, während das dritte und auch größte Exon die zweite Calcium-bindende EF-Hand-Domäne und die Sequenzwiederholungen enthält (Presland *et al.*, 1992, Henry *et al.*, 2012).

1.5 Filaggrin

Das Histidin-reiche Protein Filaggrin wurde 1981 erstmals aus der Epidermis einer Maus isoliert und als Strukturprotein des *Stratum corneum* beschrieben. Aufgrund seiner Filament-bindenden Eigenschaften nannte man es „Filament aggregating protein“, kurz Filaggrin (Steinert *et al.*, 1981).

Es konnte 1989 gezeigt werden, dass das Profilaggrin-Gen des Menschen im epidermalen Differenzierungskomplex auf Chromosom 1 liegt und für ein Vorläuferprotein kodiert, welches zehn bis zwölf der 37 kDa großen Filaggrin-Monomere enthält (McKinley-Grant *et al.*, 1989, Sandilands *et al.*, 2006). Das stark phosphorylierte, 400 kDa große Vorläuferprotein Profilaggrin, liegt in F-Keratohyalin granula gespeichert im *Stratum granulosum* vor (Steven *et al.*, 1990) und wird im Zuge der epidermalen Differenzierung durch verschiedene Proteasen (z.B. Matriptase, List *et al.*, 2003) proteolytisch gespalten.

Filaggrin gehört zu der „S100 Fused Type“-Proteinfamilie des epidermalen Differenzierungskomplexes. Außerdem gehören zu dieser Familie Trichohyalin (Lee *et al.*,

1 Einleitung

1993), Trichohyalin-like 1 (Wu *et al.*, 2011), Repetin (Huber *et al.*, 2005), Hornerin (Takaishi *et al.*, 2005), Filaggrin-2 (Wu *et al.*, 2009) und Cornulin (Contzler *et al.*, 2005). Die typische Struktur der „S100 Fused Type“-Familie findet sich auch im Profilaggrin wieder (siehe Abb. 1.2). Es besteht aus drei Exons und zwei dazwischen liegenden Introns. Das erste Exon besteht aus 15 bp und wird nicht translatiert. Das zweite 159 bp große Exon beinhaltet das Start-Codon, sowie die erste Calcium-bindende Domäne. Das dritte Exon enthält die zweite EF-Hand-Domäne, 10-12 Filaggrin-Sequenzwiederholungen, sowie den C-Terminus (Presland *et al.*, 1992, Sandilands *et al.*, 2006). Die jeweils 324 Aminosäuren langen Filaggrin-Repeats sind durch kurze Linker-Regionen miteinander verbunden, an denen verschiedene Proteasen die Filaggrin-Monomere voneinander trennen. Flankiert werden sie von zwei partiellen Filaggrin-Repeats (Gan *et al.*, 1990, Sandilands *et al.*, 2006). Das dritte Exon ist insgesamt, abhängig von der Menge der enthaltenen Filaggrin-Repeats, ca. 10000-12000 bp groß.

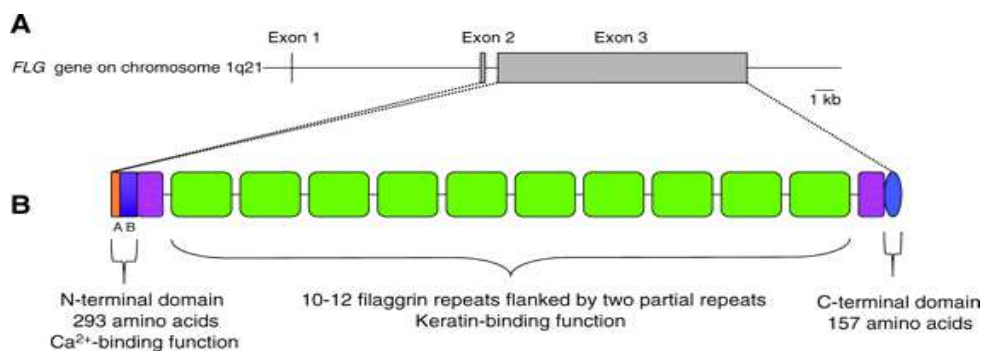


Abb. 1.2: Aufbau des humanen Profilaggrins

A: Genstruktur. Das Filaggrin-Gen liegt im epidermalen Differenzierungskomplex auf Chromosom 1q21 und beinhaltet drei Exons und zwei Introns, wobei der Hauptteil des Profilaggrin-Proteins durch das Exon 3 kodiert wird.

B: Proteinstruktur. Profilaggrin ist ein Polypeptid, das zehn bis zwölf nahezu identische Filaggrin-Repeats enthält. Flankiert werden diese Filaggrin-Monomere von partiellen Filaggrin-Repeats. Jedes Filaggrin-Monomer ist 324 AS lang und durch kurze Linker-Regionen von den benachbarten Einheiten getrennt. Der N-Terminus besteht aus einer A- und einer B-Domäne. Die A-Domäne beinhaltet zwei Calcium-bindende Motive. Außerdem ist die C-terminale Domäne zu erkennen (aus Sandilands *et al.*, 2009).

Die 293 Aminosäuren große N-terminale Region wird unterteilt in eine A- und eine B-Domäne (Presland *et al.*, 1992, Pearton *et al.*, 2002). Die A-Domäne (81 Aminosäuren) enthält die beiden Calcium-bindenden Motive, die B-Domäne (212 Aminosäuren) beinhaltet vermutlich ein Signal, das die Translokation der von den Filaggrin-Repeats gespaltenen N-terminalen Domäne in den Zellkern ermöglicht. Ishida-Yamamoto zeigte, dass der N-Terminus in Zellkernen von apoptotischen Keratinozyten zu finden ist, die kurz vor ihrer Denukleation

stehen. Aus diesem Grund wird vermutet, dass die N-terminale Domäne hier eine entscheidende Rolle in der terminalen Differenzierung von Keratinozyten zu Korneozyten spielt (Ishida-Yamamoto *et al.*, 1998). Die Funktion der C-terminalen Domäne ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch wird vermutet, dass sie eine Rolle in der Prozessierung von Profilaggrin zu Filaggrin spielt (Sandilands *et al.*, 2007).

Viele der Proteine deren Gene im epidermalen Differenzierungskomplex liegen, stehen im Verdacht potentielle Verursacher von verschiedenen Hauterkrankungen zu sein. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Mutationen im Profilaggrin-Gen einen starken Risikofaktor für die atopische Dermatitis (AD) darstellen und der Auslöser der Ichthyosis vulgaris sind (Palmer *et al.*, 2006, Smith *et al.*, 2006). Die AD ist eine Krankheit, die gekennzeichnet ist durch rote, schuppige und juckende Hautareale, typischerweise in den Gelenkbeugen, dem Gesicht, sowie Hals und Nacken (Pschyrembel, 2004). Die AD oder auch das atopische Ekzem gehört zu den Manifestationsformen der Atopie. Diese bezeichnet eine Überempfindlichkeit des Körpers auf bestimmte Reize, welche eine Reaktion vom Soforttyp auslöst und insgesamt eine chronische Entzündung hervorruft, die durch zahlreiche Faktoren wie Stress oder saisonbedingter Allergenexposition beeinflusst werden kann (Pschyrembel, 2004). Es wird angenommen, dass Mutationen im Profilaggrin-Gen Barriere-Defekte in der Epidermis verursachen und dadurch Allergene in die Haut eindringen können (Irvine und McLean, 2006). Dort lösen sie Immunreaktionen aus, welche zur Sensibilisierung und der eben beschriebenen chronischen Inflammation führen. Aufgrund dieser Tatsache gelten diese Mutationen als einer der wichtigsten Riskofaktoren für die AD.

Die Ichthyosis vulgaris ist eine Verhornungsstörung, die sich durch trockene, raue, schuppige Haut auszeichnet. Die häufigste Form der Ichthyosis vulgaris wird autosomal-dominant vererbt und durch Nullmutationen im Filaggrin-Gen hervorgerufen (Smith *et al.*, 2006). Es findet sich eine dunkelgraue, teils grünliche Schuppung der Haut, sowie eine ausgeprägtere Furchung der Handflächen und Fußsohlen (Pschyrembel, 2004), wobei der Ausprägungsgrad der Ichthyosis sehr variabel ist. Die heterozygote Form zeigt sich dabei milder als die homozygote Form (Smith *et al.*, 2006).

Mutationen des Profilaggrin-Gens sind vermutlich im Allgemeinen Risikofaktoren für viele Aspekte der Atopie, da auch bei AD assoziiertem Asthma (Brown *et al.*, 2008) und der IgE-vermittelten Erdnussallergie (Brown *et al.*, 2011) die gestörte Profilaggrinsynthese eine große Rolle spielt. Dies ist wahrscheinlich, wie bereits beschrieben, auf eine Funktionsstörung der Hautbarriere zurückzuführen, die offenbar eine Schlüsselrolle bei vielen allergischen Krankheiten inne zu haben scheint.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

In unserer Arbeitsgruppe konnte im Rahmen mehrerer Studien antimikrobielle Aktivität für die „S100 Fused Type“-Proteine Hornerin und Filaggrin-2 nachgewiesen werden. Die Vermutung, dass das ebenso zu dieser Proteinfamilie gehörende Profilaggrin, welches während der epidermalen Differenzierung in Filaggrin-Monomere gespalten wird und eine wichtige Rolle bei der Aggregation und Ausrichtung der Keratinfilamente spielt, auch über antimikrobielle Eigenschaften verfügt, sollte nachfolgend geprüft werden.

Durch HPLC-Analysen von Trypsin-verdauten Proteinextrakten aus dem *Stratum corneum* konnten N-terminale Sequenzen des Profilaggrin gefunden werden, welche antimikrobielle Aktivität gegen das Bakterium *Escherichia coli* zeigten. Im Rahmen der Dissertationen von D. Karsch und Ch. Schulz konnte dann die antimikrobielle Wirksamkeit spezifischer N-terminaler Fragmente des Profilaggrins nachgewiesen werden (Schulz, 2010, Karsch, 2011). Während der Dissertation von A. Schmidt wurde außerdem antimikrobielle Aktivität für Fragmente aus den Filaggrin-Repeats nachgewiesen (Schmidt, 2012).

Um die Sequenzen des N-Terminus nachfolgend noch weiter einzugrenzen und die ursächlichen Areale, welche gegen pathogene Keime wirksam sind ausfindig zu machen, wurden drei weitere Peptidfragmente ausgewählt und in der vorliegenden Arbeit auf antimikrobielle Aktivität hin untersucht. Dafür wurden die Fragmente FLG₁₆₂₋₂₀₇ und FLG₁₇₆₋₂₀₇ rekombinant hergestellt, während das kleinere FLG₁₆₂₋₁₈₄ synthetisch im Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig hergestellt wurde und direkt für die antimikrobielle Testung genutzt werden konnte.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

1kb DNA Größenstandard (Quick Load)	New England Biolabs
1kb DNA Smart Ladder	Eurogentec
Acetonitril	Promochem GmbH
Agarose	Biozym
dNTPs	ThermoScientific/ Fermentas
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Scientific/ Fermentas
Glycerin	USB
H ₂ O (für HPLC)	Promochem GmbH
Humane genomische DNA	Promega
IPTG	Roth
Isopropanol	Roth
Kanamycin	Roth
Ampicillin	Roth
Clarithromycin	Roth
Tetracyclin	Sigma
Trifluoressigsäure (TFA)	Promochem GmbH
Lysozym	Sigma in 0,01 % Essigsäure gelöst

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt) oder Sigma (Steinheim) bezogen.

2.2 Vektoren

pJet 1.2/blunt-Vektor	ThermoScientific/ Fermentas
pE-SUMO3-Vektor	Life Sensors

2.3 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide (Primer) wurden von Sigma-Genosys (Steinheim) synthetisiert.

Primer für Standard-PCR und pE-SUMO3-System

Bezeichnung 5'-3'-Sequenz

FLG-162-f (*Bsal*) AAGGTCTCAAGGTATGAAAGGATATTCACCTACTCATAGAG
(41 bp, Schmelztemperatur: 72,4 °C)

FLG-176-f (*Bsal*) AAGGTCTCAAGGTATGAACCATCATAACTCAAGTAAAAAAG
(41 bp, Schmelztemperatur: 72,6 °C)

FLG-207-r (*XbaI*) TCTAGATCATTCTCTTCAAGTCTTTCACCTTAGCCTC
(37 bp, Schmelztemperatur: 71,0 °C)

Die Arbeitslösungen aller Primer hatten eine Konzentration von 10 µM.

Vektorprimer für Colony-Check-PCR und Sequenzierungen

T7-reverse-Primer TAGTTATTGCTCAGCGGTGG

pJet1.2 forward sequencing primer CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC

pJet1.2 reverse sequencing primer AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG

2.4 Enzyme

Phusion Hotstart Polymerase,	Thermo Scientific/
5x Phusion HF Puffer	Fermentas

T4-DNA-Ligase,	Thermo Scientific/
Ligation Puffer	Fermentas

Taq-DNA-Polymerase,	Genaxxon bioscience GmbH
10x PCR Puffer E	

Restriktionsenzyme : <i>Xba</i> I FD	Thermo Scientific/ Fermentas
<i>Bsa</i> I FD	Thermo Scientific/ Fermentas
10x FD (Green) Puffer	Thermo Scientific/ Fermentas

2.5 Puffer und Lösungen

DNA-Ladepuffer L VI (für Agarose-Gel) (6x)	0,25 % Bromphenolblau 30 % Glycerin 10 mM Tris/HCl (pH 7,0)
His Trap HP-Säule:	
Lösung A	20 mM Natriumphosphat 0,5 M NaCl pH 7,4
Elutionslösung B	20 mM Natriumphosphat 0,5 NaCl 500 mM Imidazole
NPI-20 (Natrium-Phosphat-Imidazol)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 20 mM Imidazol pH 8,0
Jupiter 5U C18 300Å-(150 x 2 mm)-Säule:	
Lösung A	0,1 % TFA H ₂ O
Elutionslösung B	80 % Acetonitril 0,1 % TFA

2 Material und Methoden

Jupiter 5U C18 300Å-(150 x 4,6 mm)-Säule:

Lösung A	0,05 % TFA H ₂ O
----------	--------------------------------

Elutionslösung B	80 % 2-Propanol 0,05 % TFA
------------------	-------------------------------

Laufmittel des Massenspektrometers:	50 % Acetonitril 0,2 % Ameisensäure
-------------------------------------	--

50x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA)	242,30 g/L Tris 60,05 g/L Eisessig 18,6 g/L EDTA · Na ₂ · 2H ₂ O pH 8,5
-----------------------------------	--

2.6 Nährmedien

SOC-Medium	2 % Pepton 0,5 % Hefe – Extrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl nach Autoklavieren hinzugeben: 20 mM Glukose 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄
------------	---

LB-Medium (Lysogenic Broth)	1 % Sojamehlpepton 0,5 % NaCl 0,5 % Hefe-Extrakt ad 1000 ml mit H ₂ O, pH 7,4 mit HCl eingestellt, autoklaviert
-----------------------------	---

LB-Agar	LB-Medium 15 g Agar/l
---------	--------------------------

2 Material und Methoden

Radialer Plattendiffusionstest:

TSB-Medium (Tryptic Soy Broth)	3 g TSB 100 ml H ₂ O
Underlay	1g Agarose 20 µl Tween 20 1 ml TSB-Medium 10 ml Stammlösung (Natrium- phosphatpuffer; 0,1 M; pH 7,2) 90 ml H ₂ O 25 min autoklaviert
Overlay	1 g Agarose 3,4 g Caseinpepton 0,6 g Sojamehlpepton 0,5 g Glucose (D+-Glc-Monohydrat) 1 g NaCl 0,5 g Kaliumhydrogenphosphat 100 ml H ₂ O 25 min autoklaviert

2.7 Kits

GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Scientific/ Fermentas
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific/ Fermentas

2.8 Einwegmaterial

Einmalküvetten (Photometer)	Sarstedt
Filter (0,2 µm; 0,45 µm)	Sarstedt
Petrischalen (92 x 16 mm; mit Nocken)	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
Probengefäße (0,5-50 ml)	Sarstedt

2.9 Geräte

Gelkammern:

Horizon® 11.14

LifeTechnologies

Thermocycler:

T3-Thermocycler

Biometra

peqSTAR 96 Universal

Peqlab

UV-Tisch:

Dual Intensity Ultraviolet

Transilluminator TM-20

UVP

Geldokumentationskamera:

BioDoc II

Biometra

Rotationsschüttler:

VF II – Vortex-Schüttler

Janke&Kunkel IKA®

Reax 2000 Reagenzglasschüttler

Heidolph

Photometer:

NanoDrop 1000 Spectrophotometer

Thermo Scientific/

Fermentas

BioPhotometer

Eppendorf

Elektroporator:

MicroPulser™ Electroporator

BIO-RAD

Elektroporatorküvetten:

Gene Pulser/MicroPulser Cuvettes

BIO-RAD

Schüttler:

Minitron

INFORS HAT

Thermomixer 5436

Eppendorf

Inkubator:

CO₂ Inkubator

Thermo Scientific/

Fermentas

2 Material und Methoden

Ultraschallgerät:

Sonopuls GM70

Bandelin

Laborwaage:

Analysewaage

Kern & Sohn GmbH

HPLC-Anlage:

SPD-10A UV-VIS DETECTOR

Shimadzu

LC-10AT Liquid Chromatograph

Shimadzu

FCL-10AL Gradient Valve

Shimadzu

Degasser

Knauer

ÄKTAmicro™

GE Healthcare

Ettan LC

GE Healthcare

UV-Integrator:

SP 4270 Integrator

Spectra-Physics

FPLC-Anlage:

ÄKTApurifier™

GE Healthcare

Massenspektrometer:

Waters Micromass QTOF II

Waters Micromass

Zentrifugen:

Heraeus Multifuge X3R Centrifuge

Thermo Scientific

Heraeus Fresco 21 Centrifuge

Thermo Scientific

Centrifuge 5417 R

Eppendorf

Centrifuge 5804 R

Eppendorf

Labor-pH-Meter:

inoLab pH 720

WTW

H₂O - Aufbereitungsanlage:

TKA Smart2Pure

Thermo Scientific/
Fermentas

2 Material und Methoden

(Vakuum)Konzentrator:

Concentrator 5301

Eppendorf

Lyophilisator:

Gefriertrocknungsanlage

Christ

ALPHA 2-4 LSC

Säule der immobilisierten Metallionenaffinitätschromatographie:

HisTrap HP 1 ml Columns

GE Healthcare

Säule der Größenausschlusschromatographie:

HiPrep™ 26/10 Desalting Column

GE Healthcare

HPLC-Trennsäulen:

Jupiter 5U C4 300Å (250 x 4,6 mm)

Phenomenex

Jupiter 5U C18 300Å (150 x 2mm)

Phenomenex

Jupiter 5U C18 300A (150 x 4,6 mm)

Phenomenex

2.10 Mikroorganismen

E. coli XL1-Blue-supercompetent-cells

Stratagene

E. coli BL21(DE3)pLysS

Novagen

Mikrobiologische Testung:

Candida albicans

ATCC 24433

Escherichia coli

ATCC 11303

Pseudomonas aeruginosa

ATCC 10145

Staphylococcus aureus

ATCC 6538

Alle ATCC-Stämme wurden vom Institut für Infektionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel bereit gestellt.

2.11 Molekularbiologische Methoden

2.11.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Mullis et al., 1986) ist eine Methode, mit der ein kurzer, genau definierter Teil eines DNA-Strangs *in vitro* vervielfältigt werden kann. Dazu benötigt man das Enzym DNA-Polymerase, welches *in vivo* in jedem Lebewesen vorhanden ist. Es verdoppelt die DNA während der Replikation vor der Zellteilung. *In Vitro* werden häufig thermostabile Polymerasen, wie z.B. die des Bakteriums *Thermus aquaticus* benutzt (Taq-Polymerase). Für die Durchführung der PCR wird eine Matrizen-DNA (Template) benötigt, sowie zwei Primer, die den zu vervielfältigenden Bereich begrenzen. Des Weiteren werden Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) als DNA-Bausteine verwendet, Mg^{2+} , welches essentiell für die Polymerase ist und verschiedene Pufferlösungen, die eine optimale Umgebung für die Polymerase herstellen. Die PCR läuft nun in bestimmten Zyklen ab, die sich 20-50 mal wiederholen. Im sogenannten Thermocycler werden die benötigten Temperaturen präzise nach einem vorgegebenen Muster eingestellt. Während der Denaturierung bei 92-95 °C werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Doppelsträngen eines DNA-Stranges aufgebrochen, so dass die DNA, ebenso wie die Primer in Einzelsträngen vorliegen. Im folgenden Schritt, der Primerhybridisierung (Annealing), wird die Temperatur herabgesetzt, um eine optimale Anlagerung der Primer an die DNA zu gewährleisten. Ist die Annealingtemperatur zu niedrig, können die Primer auch an nicht gänzlich passende Sequenzen binden. Ist die Temperatur hingegen zu hoch, können die Primer nicht richtig binden, sodass es zu gar keinen Produkten kommt. Aus diesem Grund muss eine Temperatur gewählt werden, die die optimale Primeranlagerung gewährleistet. Diese liegt in den meisten Fällen einige Grad Celsius unterhalb der Schmelztemperatur der Primer und dient als Richtwert für die zu wählende Annealingtemperatur. In der darauf folgenden Elongation, füllt die DNA-Polymerase die Stränge mit den komplementären Nukleotiden auf (5'->3'-Syntheserichtung), wodurch neue Doppelstränge entstehen. Die Temperatur hängt hierbei vom Arbeitsoptimum der Polymerase ab (68-72 °C). Diese Zyklen werden wiederholt, wobei die Produkte der vorherigen Zyklen, als Matrizen für die folgenden Durchgänge dienen. Dadurch entsteht theoretisch eine exponentielle Vervielfältigung der DNA. Nach ca. 40 Zyklen, tritt jedoch eine Sättigung ein, es kommt zu einer sogenannten Plateau-Phase. Aus diesem Grund umfasst die PCR, je nach Reaktionsgemisch, im Normalfall 20-40 Wiederholungen. Die Amplifikation kann dann nicht mehr optimal ablaufen, da die Reagenzien limitiert sind und es auch zu inhibierenden Nebenprodukten kommen kann.

2.11.1.1 Standard-PCR

In der ersten PCR wurden zunächst aus genomischer DNA mit den spezifischen Primern FLG-162-f, FLG-176-f und FLG-207-r die zu untersuchenden Fragmente hergestellt.

Hierzu wurde eine Phusion Hotstart-Polymerase verwendet. Diese ist eine Proofreading-Polymerase, was bedeutet, dass sie falsch eingebaute Nukleotide erkennt und entfernt. Durch diesen Mechanismus hat sie eine wesentlich niedrigere Fehlerrate als die Taq-Polymerase, da durch den Korrektur-Mechanismus die Anzahl an Mutationen in der entstehenden DNA-Sequenz gesenkt werden kann. Sie beinhaltet außerdem bestimmte Moleküle (Affibodies), die die Polymerase bei Raumtemperatur und niedrigeren Temperaturen inhibieren. Sobald die Elongationstemperatur der PCR erreicht ist, lösen sich die Affibodies und geben die Polymerase frei. Somit benötigt sie keinen separaten Aktivierungsschritt. Außerdem wird die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität durch die Affibodies blockiert, was die Primer und das Template während der Fertigstellung des Reaktionsansatzes vor einem Abbau schützt.

Folgender Reaktionsansatz wurde für die modifizierte Standard-PCR verwendet:

50 µl Ansatz:

10 µl	5xPhusion Buffer
1 µl	dNTPs (10 mM)
1,7 µl	FLG-162-f-Primer bzw. FLG-176-f-Primer (10 µM)
1,7 µl	FLG-207-r-Primer (10 µM)
3 µl	humane genomische DNA (129 ng/µl)
1 µl	Phusion Hotstart Polymerase (2 U/µl)
31,6 µl	H ₂ O

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

98 °C 30 sec
10x:
98 °C 8 sec
45 °C 17 sec
72 °C 15 sec
28x:
98 °C 8 sec
50 °C 17 sec
72 °C 15 sec
72 °C 10 min
8 °C ∞

2.11.1.2 Colony-Check-PCR

Die Colony-Check-PCR wird durchgeführt, um zu kontrollieren, ob die Bakterien einen Vektor mit inseriertem PCR-Produkt aufgenommen haben.

Dazu wurden mit einer Pipettenspitze jeweils fünf Kolonien (der Fragmente FLG₁₆₂₋₂₀₇ bzw. FLG₁₇₆₋₂₀₇) ausgewählt, direkt von der Agarplatte aufgenommen und in einem 20 µl-PCR-Ansatz resuspendiert.

20 µl-Ansatz für die Colony-Check-PCR des pJet1.2/blunt-Vektors:

2 µl	10x Puffer E
0,4 µl	dNTPs (10mM)
0,4 µl	pJet1.2 forward sequencing primer (10µM)
0,4 µl	pJet1.2 reverse sequencing primer (10µM)
0,1 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
16,7 µl	H ₂ O

Bei der Colony-Check-PCR im pJet1.2/blunt-Vektor wurden der pJet1.2 forward sequencing primer, sowie der pJet1.2 reverse sequencing primer, die auf dem Vektor selbst binden benutzt, um anhand der Fragmentgröße zu erkennen, ob der Vektor das Insert aufgenommen hat.

Der 20 µl-Ansatz für die Colony-Check-PCR des pE-SUMO3-Vektors wurde nach dem selben Protokoll angefertigt. Hierfür wurden die Forward-Primer FLG-162-f bzw. FLG-176-f und der T7-reverse-Primer verwendet, welcher 140 bp nach dem Insert auf dem Vektor bindet.

Das PCR-Programm der Colony-Check-PCRs setzte sich wie folgt zusammen:

<u>95 °C</u>	<u>10 min</u>	→ Bakterien lysiert, DNA frei zur Amplifikation
30x:		
95 °C	30 sec	
55 °C	30 sec	
<u>72 °C</u>	<u>30 sec</u>	
72 °C	5 min	
10 °C	∞	

2.11.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese ist ein Verfahren, das es ermöglicht, Moleküle nach ihrer Größe aufzutrennen. Die Bestimmung der Größe erfolgt mit Hilfe eines Größenstandards, der zusätzlich zu den Proben auf das Gel aufgetragen wird. Die negativ geladene DNA wandert unter Anlage eines elektrischen Feldes durch das Agarose-Gel in Richtung Anode und trennt sich währenddessen auf, da kleine Moleküle schneller laufen als große.

Es wurden Gele mit Konzentrationen von 0,8-1,5 % Agarose hergestellt. Die benötigte Menge Agarose wurde zunächst in 1xTAE-Puffer aufgeköcht. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C folgte die Zugabe von 15 µl Ethidiumbromid (3,33 mg/ml). Das Ethidiumbromid interkaliert in der DNA, wodurch diese unter UV-Licht sichtbar gemacht wird. Die noch flüssige Lösung wurde dann in eine horizontale Gelkammer mit Probenkamm gegeben und härtete bei Raumtemperatur aus. Der Probenkamm wurde danach entfernt und die Laufkammer mit 1xTAE-Puffer aufgefüllt, sodass das Gel vollständig bedeckt war.

Die Taschen wurden mit den PCR-Produkten (50 µl-Ansatz), welche vorher mit 10 µl 6xLadepuffer LVI versetzt wurden, befüllt. Für die Colony-Check-PCR (20 µl-Ansätze) wurden jeweils 4 µl des 6xLadepuffers LVI verwendet. Daneben wurde ein entsprechender DNA-Größenstandard aufgetragen. Es wurde ein elektrisches Feld angelegt und die Proben liefen solange, bis sich die Banden gut aufgetrennt hatten. Danach erfolgte die Begutachtung und Auswertung der fluoreszierenden Banden unter UV-Licht.

2.11.3 Gel-Extraktion

Mithilfe des DNA-Größenstandards konnte die Größe der Fragmente ermittelt werden. Die Fragmente, welche die entsprechende Größe aufwiesen, wurden zur Weiterverarbeitung bestimmt und mit Hilfe der fluoreszierenden Banden unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell herausgeschnitten.

Im folgenden musste das DNA-Material aus dem Gel extrahiert werden. Dies erfolgte mittels GeneJET Gel-Extraktion Kit nach Angaben des Herstellers. Lediglich die Elution der Proben erfolgte mit 30µl, anstatt mit 50µl.

2.11.4 Ligation

Die Ligation stellt die Möglichkeit einer enzymkatalysierten Verknüpfung zweier DNA- oder RNA-Fragmente an ihren Enden dar. Das 3'-Hydroxy-Ende wird dabei mit dem 5'-Phosphat-Ende durch eine Ligase unter Herstellung einer Phosphodiesterbindung verbunden. Beim sogenannten Klonieren wird fremde DNA in einen Vektor eingebracht. Vektoren sind Abkömmlinge der natürlich vorkommenden Plasmide in Bakterien, welche dort extrachromosomale, doppelsträngige DNA-Moleküle in Ringstruktur darstellen. Diese enthalten verschiedenen Gene, die z.B. für Antibiotika-Resistenzen kodieren. Die genetisch veränderten Vektoren enthalten außerdem eine „Multiple Cloning Site“ (MCS), welche Erkennungssequenzen für verschiedene Restriktionsenzyme enthält. Durch die Behandlung mit diesen Enzymen, können spezielle Überhänge generiert werden, die für den Vektor und das gewünschte Insert komplementär sind.

Als Klonierungsvektor wurde der pJet1.2/blunt-Vektor verwendet, als Expressionsvektor der pE-SUMO3-Vektor. Der pJet1.2/blunt-Vektor liegt linearisiert vor und verfügt über sogenannte „blunt ends“ (stumpfe Enden). Die durch die PCR mit einer Proofreading-Polymerase entstandenen Produkte haben ebenso „blunt ends“ und können aus diesem Grund direkt in den Vektor ligiert werden.

An dem pE-SUMO3-Vektor, welcher in Ringstruktur vorliegt, entstehen durch den Schnitt mit einem Restriktionsenzym zwei verschiedene Überhänge („sticky ends“, klebrige Enden). Die gewünschten Inserts werden ebenso mit Restriktionsenzymen geschnitten und erhalten dadurch die selben Überhänge. Somit können sie in den Vektor ligiert werden. Nachdem die DNA in den Vektor eingefügt wurde, kann dieser in Bakterienstämme transformiert werden.

10 µl-Ligationsansatz für den pJet1.2/blunt-Vektor:

5 µl	2xReaktionspuffer
0,5 µl	pJet1.2/blunt-Vektor (25 ng)
0,5 µl	T4-DNA-Ligase (1 U/µl)
4 µl	PCR-Produkt (FLG ₁₆₂₋₂₀₇ = 4,03 ng/µl, FLG ₁₇₆₋₂₀₇ = 4,17 ng/µl)

10 µl-Ligationsansatz für den pE-SUMO3-Vektor:

1 µl	10xReaktionspuffer
2 µl	pE-SUMO3-Vektor (35 ng)
0,5 µl	T4-DNA-Ligase (1 U/µl)
2,6 µl	PCR-Produkt (FLG ₁₆₂₋₂₀₇ = 3,0 ng/µl)
bzw. 1,29 µl	PCR-Produkt (FLG ₁₇₆₋₂₀₇ = 4,72 ng/µl)
3,9 µl	H ₂ O (FLG ₁₆₂₋₂₀₇)
bzw. 5,2 µl	H ₂ O (FLG ₁₆₂₋₂₀₇)

Das Verhältnis von Vektor und Insert wurde so eingestellt, dass das Insert mindestens in achtfachem molaren Überschuss vorlag.

Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.

2.11.5 Transformation

Die Transformation ist ein Verfahren mit dessen Hilfe man rekombinante DNA, eingeschlossen in einem Vektor, in Bakterien einbringen kann, sodass diese die DNA vervielfältigen können.

Für eine Transformation werden kompetente Bakterien benötigt, das bedeutet, sie müssen in der Lage sein, freie DNA aufzunehmen. Bei der hier durchgeführten Elektroporation mussten elektrokompente Bakterien verwendet werden, welche durch verschiedene Behandlungsschritte nur noch einen sehr geringen Salzgehalt in der Suspension aufweisen. Bei der Elektroporation wird durch einen Kondensator ein elektrisches Feld erzeugt. Durch die Spannung entstehen Poren in der Zellmembran der Bakterien, wodurch die DNA eindringen kann. Der geringe Salzgehalt der Suspension verhindert hier ein zu schnelles Abfallen der Spannung.

Für die Transformation der pJet1.2-Vektoren mussten zur Vorbereitung zunächst 10 µl Ligationsprodukt mit 10 µl Chloroform angereichert werden. Dies diente dazu, die Vektoren aus der Ligations-Lösung von den dort enthaltenen Proteinen und dem bei blunt-end-Ligationen verwendeten Polyethylenglykol zu trennen. Eine Zentrifugation wurde durchgeführt, um die Phasen voneinander zu trennen. Es wurden 50 µl XL1-Blue-supercompetent-cells aufgetaut und 500 µl SOC-Medium warm gestellt (37 °C). Jeweils 2 µl des Ligationsproduktes wurden dann zu den Bakterien gegeben und im Elektroporator einem elektrischen Feld ausgesetzt.

Anschließend wurde das SOC-Medium dazu gegeben und die Tubes für 1 h im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Zum Schluss wurden die Bakterien auf vorbereiteten Agar-Platten ausplattiert. Der Agar wurde zuvor mit zwei Antibiotika versetzt. Zum einen wurde Tetracyclin verwendet, gegen welches die Bakterien resistent sind und zum anderen Ampicillin, gegen welches der Vektor ein Resistenz-Gen besitzt. Somit wurde gewährleistet, dass auf diesen Platten nur Bakterien wachsen, die den Vektor aufgenommen haben. Jeweils fünf Kolonien wurden im Anschluss mit einer Colony-Check-PCR nochmals überprüft.

Nach erfolgreicher Transformation wurden jeweils zwei Klone ausgewählt, die in eine Flüssigkultur mit LB-Medium und Antibiotika überführt wurden. Diese wurden über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert, sodass am nächsten Tag die Aufreinigung des entsprechenden

Plasmids erfolgen konnte. Ebenso wurde die später folgende Transformation der pE-SUMO3-Vektoren vorgenommen. Zunächst erfolgte eine Transformation in die XL1-Blue-supercompetent-cells, nachfolgend in die BL21(DE3)pLysS-Bakterien. Auf eine vorherige Zugabe von Chloroform konnte hier verzichtet werden.

Tab. 2.1: Antibiotika-Resistenzen der verwendeten *E. coli*-Stämme und Vektoren

<i>E. coli</i>-Stamm	Antibiotika-Resistenz	Endkonzentration
XL1-Blue-supercompetent-cells	Tetracyclin	12,5 µg/ml
BL21(DE3)pLysS	Chloramphenicol	34 µg/ml
pJet1.2/blunt	Ampicillin	100 µg/ml
pE-SUMO3	Kanamycin	50 µg/ml

2.11.6 Isolierung von Plasmid-DNA

Um die Plasmid-DNA für die folgende Restriktionshydrolyse wieder zugänglich zu machen, wurde sie mittels des GeneJet Plasmid Miniprep aus den Bakterien isoliert. Dies erfolgte nach den genauen Angaben des Herstellers. Das Prinzip beruht auf einer Lyse der Bakterien, gefolgt von der selektiven Bindung der Plasmid-DNA an eine Silica-Membran. Darauf folgt die Elution. Das erhaltene Eluat (Plasmid in 50 µl Elutionspuffer) wurde danach im Nano-Drop einer Konzentrationsbestimmung unterzogen.

2.11.7 Restriktionshydrolyse

Im nächsten Schritt mussten zunächst die Profilaggrin-Fragmente aus dem pJet1.2/blunt-Vektor mittels Restriktionsenzymen herausgeschnitten werden, um sie danach in den Expressionsvektor pE-SUMO3 zu überführen.

Die Inserts besitzen, eingefügt durch die Primer, am Anfang ihrer Sequenzen eine Schnittstelle für *Bsa*I (Äquivalent zum Isoschizomer *Eco*31I) und am Ende, eine Schnittstelle für *Xba*I. Somit konnten die Inserts anhand dieser Enzyme spezifisch aus dem Vektor herausgeschnitten werden. Durch weitere Ansätze mit nur je einem Restriktionsenzym sollte deren korrekte Arbeitsweise kontrolliert werden.

In der nachfolgenden Gelelektrophorese wurden die jeweiligen Fragmente anhand ihrer Größe überprüft. Die elektrophoretisch getrennten Banden, welche die ausgeschnittenen Inserts enthielten, wurden aus dem Gel geschnitten und mittels Gelextraktion in 30 µl Elutionpuffer eluiert.

2 Material und Methoden

Folgendes Pipettierschema wurde verwendet:

Doppelrestriktionshydrolyse 50µl-Ansatz :

3 µg Plasmid	FLG ₁₆₂₋₂₀₇ : 8,2 µl
	FLG ₁₇₆₋₂₀₇ : 9,6 µl
2 µl	<i>Xba</i> I FD
2 µl	<i>Bsa</i> I FD
5 µl	10x FD-Puffer (grün)
32,8 µl	H ₂ O (FLG ₁₆₂₋₂₀₇)
bzw. 31,4 µl	H ₂ O (FLG ₁₇₆₋₂₀₇)

Einzelrestriktionshydrolyse 10µl-Ansatz:

250 ng Plasmid	FLG ₁₆₂₋₂₀₇ : 0,68 µl
	FLG ₁₇₆₋₂₀₇ : 0,79 µl
0,5 µl	<i>Xba</i> I bzw. <i>Bsa</i> I
1 µl	10x FD-Puffer (grün)
7,82 µl	H ₂ O (FLG ₁₆₂₋₂₀₇)
bzw. 7,71 µl	H ₂ O (FLG ₁₇₆₋₂₀₇)

Auch der pE-SUMO3-Vektor wurde einer Restriktionshydrolyse mit *Bsa*I unterzogen, da dieser noch in Ringstruktur vorlag und erst geöffnet werden musste, um ein Insert aufnehmen zu können. Hierbei ist zu erwähnen, dass *Bsa*I außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet. Es besitzt zwei Schnittstellen, wodurch in einem Schritt zwei unterschiedliche Überhänge generiert werden können (siehe 2.12.1). Diese sind zu den Überhängen der Inserts komplementär.

Folgendes Pipettierschema wurde für einen 60 µl-Ansatz verwendet:

30 µl	pE-SUMO3-Vektor
5 µl	<i>Bsa</i> I
6 µl	10x FD-Buffer (grün)
19 µl	H ₂ O

Alle Ansätze wurden bei 37 °C im ThermoCycler für 45 min inkubiert. Danach erfolgte die Auftrennung mit der Gelelektrophorese und die Gelextraktion der Proben.

Im folgenden wurden die Fragmente in den pE-SUMO3-Vektor ligiert und nochmals in die XL1-Blue-supercompetent-cells transformiert. Danach wurde in der Colony-Check-PCR kontrolliert, ob die Inserts aufgenommen wurden. Es erfolgte eine weitere Plasmidpräparation und eine Transformation in die *E. coli*-BL21(DE3)pLysS-Expressionszellen. In einer weiteren Colony-Check-PCR wurde die erfolgreiche Transformation noch einmal kontrolliert.

2.11.8 DNA-Sequenzierung

Nach erfolgreicher Plasmidpräparation und Colony-Check-PCR wurden jeweils zwei Klone je Profilaggrin-Fragment für die Weiterverwendung ausgewählt. Für die Sequenzierung wurden jeweils 3 µl dieser Plasmid-DNA und 1 µl T7-reverse-Primer (4,8 µM) gemischt.

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruch-Synthese und ist eine Variation der PCR-Reaktion. Hierbei wird jedoch, anders als bei der PCR, nur ein Primer benutzt, sodass die DNA nur linear amplifiziert wird. Es werden neben den Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) auch mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) genutzt. Diese besitzen keine Hydroxygruppe am 3'-C-Atom, wodurch keine weitere Strangverlängerung durch Anbindung von Nukleotiden möglich ist. Aus diesem Grund kommt es durch Einbau der ddNTPs in die neu synthetisierte DNA zu Kettenabbrüchen. Bei der PCR entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt werden. Die unterschiedlich farbigen ddNTPs können somit detektiert werden und geben die Sequenz des DNA-Stranges wieder.

Die Sequenzierung wurde im Institut für Klinische Molekularbiologie der Universitätsklinik Schleswig-Holstein in Kiel durchgeführt.

2.12 Rekombinante Expression in *Escherichia coli*

2.12.1 Struktur des Expressionsvektors

Für die Herstellung der Fusionsproteine in *E. coli*-BL21(DE3)pLysS-Zellen wurde der pE-SUMO3-Vektor verwendet. Dieser 5610 bp große Vektor besitzt eine „Multiple Cloning Site“ mit verschiedenen Schnittstellen für Restriktionsenzyme. Der zirkuläre Vektor wurde zunächst mithilfe des Restriktionsenzym *Bsal* in eine lineare Form gebracht. *Bsal* schneidet außerhalb seiner Erkennungssequenz an zwei Schnittstellen, wodurch in einem Schritt zwei unterschiedliche Überhänge generiert wurden (siehe Abb. 2.1). Es entstand ein ACCT-Überhang, sowie ein CTAG-Überhang an den 5'-Enden der Einzelstränge.

Die Gensequenzen mit denen die Vektoren fusioniert werden sollten, mussten dafür vorher mittels PCR amplifiziert werden und durch eine Restriktionshydrolyse Überhänge erhalten, die zu den Überhängen des Vektors kompatibel waren. Um dies zu erreichen, wurden die Forward-Primer so konzipiert, dass sie eine *Bsal*-Erkennungssequenz (GGTCTC) enthielten. Durch eine Restriktionshydrolyse mit diesem Enzym konnte so ein komplementärer Überhang zu dem des Vektors generiert werden. Für eine effizientere Spaltung wurden zwei

2 Material und Methoden

weitere Nukleotide vor der *BsaI*-Schnittstelle eingefügt.

Die Reverse-Primer erhielten eine *XbaI*-Erkennungssequenz (TCTAGA). Durch die Restriktionshydrolyse mit diesem Enzym wurde ein Überhang generiert, der auch im Vektor durch die *BsaI*-Spaltung entstanden ist (GATC komplementär zu CTAG des Vektors). Durch diese beiden Überhänge konnten die Inserts gerichtet in die Vektoren eingebracht werden.

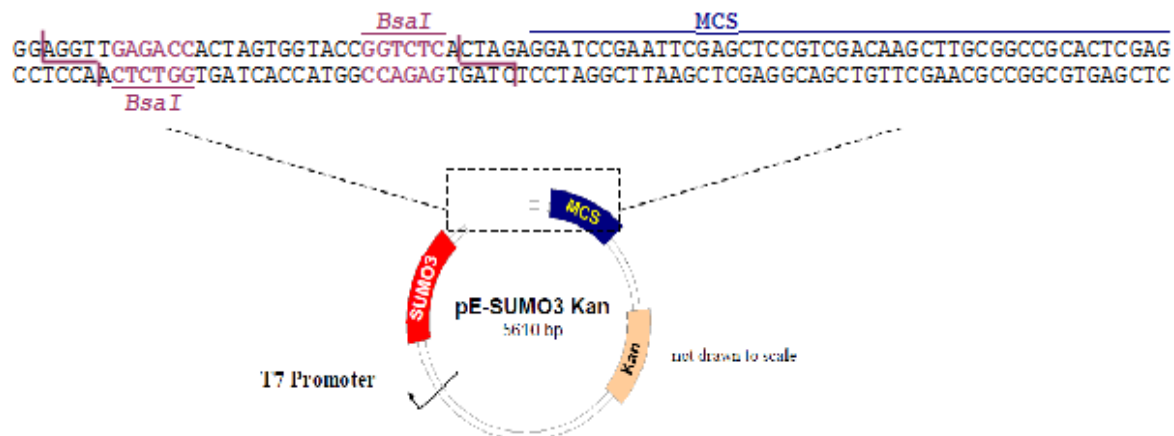


Abb. 2.1: Vektorkarte des pE-SUMO3-Expressionsvektors.

Dargestellt ist der pE-SUMO3-Vektor mit der Erkennungssequenz für *BsaI* (fett lila), sowie den Schnittstellen von *BsaI* (lila Linien). Außerdem ist die Multiple Cloning Site (MCS) zu erkennen, das Gen für die Kanamycin-Resistenz (Kan) und die SUMO-Gensequenz (SUMO).

Bearbeitete und veränderte Polylinker Map (aus pE-SUMO3-Vektor, T7, Kan, LifeSensors Inc.)

Der pE-SUMO3-Vektor besitzt weiterhin einen T7-Promotor und ein Kanamycin-Resistenz-Gen zur Selektion bei der Kultivierung der Bakterien. Zudem enthält er die Sequenz, die für den pE-SUMO3-Tag kodiert. Dieser Tag wird zusammen mit dem angefügten Insert nach der Transformation und nach Induktion mit IPTG durch die Bakterien zu einem Fusionsprotein translatiert.

Für die späteren Aufreinigungsschritte muss das jeweilige Zielprotein wieder vom pE-SUMO3-Tag abgespalten werden, damit letztendlich das gewünschte Protein isoliert vorliegt. Dies kann durch verschiedene Mechanismen erfolgen. Zum einen kann die SUMO-Protease 2 genutzt werden. Diese erkennt den pE-SUMO3-Tag an seiner Tertiärstruktur und kann den Tag vom Zielprotein abtrennen.

Zum anderen kommt eine Spaltung mittels Bromcyan in Frage, welche in dieser Arbeit genutzt wurde. Bei diesem Verfahren, wird das gewünschte Protein durch Bromcyan, welches selektiv an der Aminosäure Methionin spaltet, vom Fusionstag getrennt. In der pE-SUMO3-Gensequenz des Vektors befinden sich drei Methionin-kodierende Basentriplets, ein weiteres wurde zusätzlich mit Hilfe der Primer an die Inserts angefügt, um

hier eine Schnittstelle zu schaffen. Durch die Spaltung mittels Bromcyan, liegen also im Idealfall das abgespaltene Zielprotein, sowie mehrere pE-SUMO3-Tag-Fragmente vor. Dieses Verfahren kann jedoch nur verwendet werden, wenn das Zielprotein selbst keine Methionine aufweist.

Teil der kodierenden Sequenz des Tags ist außerdem eine Sequenz die für eine Abfolge von sechs hintereinander liegenden Histidinen kodiert, einen Hexa-Histidin-Tag. Durch diese sechs nacheinander folgenden Histidine kann später die immobilisierten Metallionenaffinitätschromatographie für einen der Aufreinigungsschritte genutzt werden (siehe 2.13.2).

2.12.2 Durchführung der Herstellung des Fusionsproteins

Die Herstellung der Fusionsproteine erfolgte in *E. coli*-BL21(DE3)pLysS-Zellen.

Die DE3-*E. coli*-Stämme enthalten das Gen für die T7-RNA-Polymerase, welches unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors steht. Nach Induktion mit IPTG transkribiert dieses Enzym die klonierten Gensequenzen, die im pE-SUMO3-Vektor unter der Kontrolle des T7-Promotors stehen. Nach erfolgreicher Transformation in die *E. coli*-BL21(DE3)pLysS-Zellen, erfolgte eine Colony-Check-PCR. Für die Herstellung der Fusionsproteine wurden nun jeweils drei positive Einzelkolonien ausgewählt und in je 20 ml LB-Medium aufgenommen, welches vorher mit Chloramphenicol und Kanamycin versetzt wurde. Über Nacht wurden diese Kulturen dann bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Am folgenden Tag wurde zunächst jeweils ein Kolben mit gut angewachsenen Bakterienkulturen ausgewählt und deren optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) im Photometer bestimmt. Hiermit kann die Dichte der Bakterien ermittelt werden um später die Expressionskulturen optimal animpfen zu können. Dafür wurden jeweils 100 µl Flüssigkultur mit 900 µl LB-Medium verdünnt. In unverdünntem Zustand wäre die Dichte der Bakterien zu hoch gewesen und hätte, aufgrund von Überlagerungsphänomenen, keinen repräsentativen Wert liefern können. Als Referenzwert diente das LB-Medium.

Für die Herstellung der Fusionsproteine wurden nun je drei Erlenmeyerkolben mit 250 ml Chloramphenicol- und Kanamycin-haltigem LB-Medium, mit der jeweiligen Menge der Flüssigkulturen auf eine OD von 0,08 angeimpft. Diese Kulturen wurden wiederum für zwei Stunden bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Für die Induktion mit IPTG sollte eine OD von 0,5-0,8 vorliegen, welche nach zwei Stunden erreicht wurde. Die jeweiligen drei Kolben mit je 250 ml der Expressionskulturen wurden daraufhin mit 250 µl 1M IPTG induziert und danach weitere 3 Stunden bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Im Anschluss wurden die

Expressionskulturen 10 min bei 6000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die entstandenen Bakterienpellets in jeweils 3 ml NPI-20 resuspendiert und zusammengeführt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.13 Aufreinigung der Profilaggrin-Fragmente

2.13.1 Aufschluss der Expressionskultur

Um die Fusionsproteine weiter aufzureinigen und später auf antimikrobielle Eigenschaften untersuchen zu können, mussten sie von den bakteriellen Bestandteilen der Kultur getrennt werden. Durch die Behandlung im Ultraschallgerät konnten die Bakterien aufgeschlossen werden (10 Zyklen: 10 sec Ultraschall, 12 sec Pause auf Eis). Im folgenden wurden die Proben für 45 min bei 4 °C und 12000 x g zentrifugiert. Das Zellpellet enthielt die Zelltrümmer der Bakterien und konnte verworfen werden. Der Überstand mit dem jeweils enthaltenen Fusionsprotein wurde 2x sterilfiltriert (Porendurchmesser 0,45µm und 0,2µm) und danach auf die immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie-Säule aufgetragen.

2.13.2 immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie

Die immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie ist ein Trennverfahren zur Isolation von Proteinen. Hiermit sollten die im Überstand noch enthaltenen bakteriellen Proteine von den gewünschten Fusionsproteinen getrennt werden. Durch die im pE-SUMO3-Tag enthaltene Hexa-Histidin-Sequenz des Fusionsproteins findet eine Interaktion mit den in der Silica-Gel-Matrix der Säule gebundenen zweiwertigen Nickel-Ionen statt. Durch die Wechselwirkung zwischen den Histidinen und den freien Bindungsstellen der Nickel-Ionen, verbleiben diese zunächst in der Säule, wohingegen sich die verschiedenen bakteriellen Proteine hauptsächlich im Durchfluss befinden. Die vorangegangene Resuspension der Bakterienpellets mit jeweils 3 µl NPI-20, sollte dafür sorgen, dass es zu weniger unspezifischen Bindungen bakterieller Proteine kommt und idealerweise nur die Fusionsproteine in der Lage sind, mit ihrem sechsfachen Histidin-Tag an der Säulenmatrix zu binden. Das Trennverfahren wurde mit der His Trap HP-Säule nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Es wurden jeweils 8 ml, welche 750 ml induzierter Flüssigkultur entsprachen, in je zwei Läufen auf die Säule aufgetragen. Mittels eines Imidazol-haltigen Elutionspuffers (500mM) und dessen ansteigenden Konzentrationsgradienten konnten die Histidine des Fusionsproteins von der Säule verdrängt und somit eluiert werden.

2.13.3 Größenausschlusschromatographie

Im folgenden wurden bei der Größenausschlusschromatographie (Entsalzung) die in der Probe enthaltenen Substanzen nach Größe aufgetrennt. Dabei eluieren große Moleküle schnell und kleine Moleküle und Salze langsam. In der Säulenmatrix enthaltene quervernetzte Polymere bilden eine Porenstruktur, in welche kleine Moleküle und Salze eindringen können. Die Fusionsproteine übersteigen in der hier verwendeten Trennsäule diese Porengröße. Dadurch können sie nicht in die Poren eindringen und bleiben im äußeren Flüssigkeitsraum (H_2O). Sie durchlaufen das Volumen außerhalb der Gelpartikel und sollten im Idealfall die Säule noch vor dem Salz, und somit von diesem getrennt, verlassen. Die Entsalzung wurde mit einer HiPrep™ 26/10 Desalting Column nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Ein Teil der aufgefangenen Proben wurde in einer Vacuum-Zentrifuge konzentriert und im Anschluss einer massenspektrometrischen Untersuchung unterzogen. Der Rest der Proben wurde bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ tiefgefroren und danach mittels Lyophilisator gefriergetrocknet. Die Lagerung erfolgte bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

2.13.4 Spaltung der Fusionsproteine mit Bromcyan

Im nächsten Schritt sollten die rekombinant hergestellten Profilaggrin-Fragmente vom pE-SUMO3-Fusionstag gespalten werden, um sie unabhängig von ihm auf antimikrobielle Eigenschaften hin untersuchen zu können. Dazu wurden die lyophilisierten Proben in H_2O aufgenommen. Es folgte eine Konzentrationsbestimmung im Nano-Drop (siehe 2.14.1), welche für die weitere Berechnung notwendig war.

Die Konzentrationen der Proteine wurden in $0,25\text{ M HCL}$ auf 1 mg/ml eingestellt.

Bromcyan spaltet C-terminal von Methioninen und musste nach Standardprotokoll im 50fachen molaren Überschuss pro Methionin hinzugegeben werden. Die Proteinsequenz der Fusionsproteine enthält insgesamt vier Methionine, sodass CNBr hier im 200fachen molaren Überschuss pro Proteinmolekül eingesetzt werden musste. Die Zugabe der Bromcyanlösung (5M) erfolgte unter dem Abzug. Anschließend folgte eine Inkubation lichtgeschützt und bei Raumtemperatur über Nacht. Dies wurde zwei mal mit $1500\text{ }\mu\text{g}$ pro Protein durchgeführt, sodass letztendlich jeweils $3000\text{ }\mu\text{g}$ gespaltenes Protein vorlagen.

Im Folgenden wurden $300\text{ }\mu\text{l}$ (entsprechend $300\text{ }\mu\text{g}$) je Protein abgenommen, um sie mit einer C18-HPLC-Trennsäule zu separieren. Das Bromcyan wurde in einer Vakuum-Zentrifuge abgedampft. Mit der entnommenen Probe von $300\text{ }\mu\text{g}$ sollte getestet werden, ob sich die Proteine von den sonstigen Bestandteilen der Lösung (Fusionstag-Bestandteile)

abtrennen lassen. Bei vollständiger Spaltung finden sich bis zu fünf Peaks im Chromatogramm. Des weiteren folgte eine Messung mittels Massenspektrometer, um die Fraktionen auf das Vorliegen der gewünschten Proteine hin zu untersuchen.

Nach erfolgreicher Abspaltung der Proteine von den Fusionstag-Bestandteilen wurden weitere Läufe in präparativen Säulen durchgeführt, um auch den Rest der Proteine aufzureinigen.

2.13.5 C18-Umkehrphasen-HPLC

Dieses chromatographische Verfahren beruht auf dem Prinzip der Wechselwirkung zwischen der stationären Phase und der Probe in der mobilen Phase. Die stationäre Phase besteht aus einem Silika-Gel an dem unpolare, hydrophobe Kohlenstoff-Ketten gebunden sind. Diese treten in Wechselwirkung mit den Bestandteilen der zu untersuchenden Probe, welche innerhalb eines Laufmittels die Säule passiert. Je stärker diese hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Kohlenstoff-Ketten der Säule und den Proteinen der Probe sind, desto länger verbleiben die Bestandteile der Probe während der Elution an der Säulenmatrix. Des weiteren werden hier Ionenverbindungen zwischen amphiphilen Ionen der stationären Phase und den Oberflächenladungen der Proteine geformt.

Während des Durchlaufs steigt die Konzentration des in dem Elutionsmittel enthaltenen Acetonitrils anhand eines zuvor festgelegten Gradienten an, wodurch sich die Zusammensetzung der mobilen Phase von hydrophil zu hydrophob verändert. Dadurch verstärken sich die Wechselwirkungen zwischen der Probe und der mobilen Phase und die Probe wird eluiert.

Für die C18-Umkehrphasen-HPLC wurden die Proben zunächst mit TFA-H₂O versetzt, welches als Ionenpaarbildner fungiert. Es wurden 100µl (entsprechend 100 µg) auf eine Jupiter 5U C18 300Å-(150 x 2 mm)-Trennsäule aufgetragen. Als Elutionslösung wurden hier 80% Acetonitril mit 0,1% TFA verwendet. Es wurde ein Gradient von Lösung A (0,1% TFA, H₂O) zu Elutionslösung B in einer Flussrate von 0,15 ml/min eingesetzt (siehe Tab. 2.3). Am Ende der Trennsäule wird die Elution der Proteine anhand von Lichtabsorptionen durch einen Detektor erfasst und die einzelnen Komponenten im Chromatogramm in einem Peak dargestellt. Die Fraktionierung der Proteine erfolgte manuell anhand der UV-Absorption bei 215 nm.

Tab. 2.3: Gradient der C18-Umkehrphasen-HPLC

Zeit t [min]	Konzentration Lösung A [%]	Konzentration Elutionslösung B [%]
0	100	0
1	100	0
10	75	25
40	30	70
50	0	100

In den Chromatogrammen war erkennbar, dass sich die Proteine gut von den Fusionstag-Bestandteilen auftrennen ließen. Somit konnten im Folgenden die restlichen 2700 µg der gespaltenen Proteine mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min über eine größere C18-Trennsäule gegeben werden. Hierfür wurde eine Jupiter 5U C18 300Å (150 x 4,6 mm)-Trennsäule verwendet. Eluiert wurde mit 80% Isopropanol mit 0,05% TFA. Vorher wurde jedoch der Gradient anhand der erhaltenen Chromatogramme optimiert, um eine möglichst gute Auftrennung der einzelnen Komponenten der Lösung zu erzielen.

Tab. 2.4: Modifizierter Gradient der C18-Umkehrphasen-HPLC

Zeit t [min]	Konzentration Lösung A [%]	Konzentration Elutionslösung B [%]
0	90	10
5	82	18
25	74	26
35	20	80
38	20	80

Die Fraktionierung erfolgte manuell anhand der UV-Absorptionen bei 215 nm.

Die aufgefangenen Proben wurden einer massenspektrometrischen Testung unterzogen. Im Anschluss wurden die für die entsprechenden Proteine positiven Proben gepoolt und in der Vakuumzentrifuge behandelt, um das Isopropanol des Elutionspuffers zu verdampfen. Danach wurden die Proben lyophilisiert und bei -20 °C gelagert.

Es folgten zwei weitere Läufe, zuvor abgenommener kleiner Mengen (5 µl, 10 µl) beider Fragmente über die C18-HPLC-Säule (Jupiter 5U C18 300Å, 150 x 2 mm), um zum einen eine zusätzliche Reinheitsprüfung durchzuführen und zum anderen, um mit der Fläche („Area under the curve“) der einzelnen Peaks die enthaltenen Proteinmengen zu berechnen (Flussrate 0,15 ml/min; Gradient siehe Tab. 2.4). Hierfür konnte nicht die photometrische Messung mit Hilfe des NanoDrops verwendet werden, da dieser nur in der Lage war bei 280 nm zu messen und so die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan zu erfassen. Diese Aminosäuren waren jedoch in den hier untersuchten Fragmenten nicht oder nur in geringem Maße enthalten. Somit wurde hier von der photometrischen Messung abgesehen. Stattdessen wurde in den erhaltenen Chromatogrammen die „Area“ an dem

entsprechenden Peak abgelesen und auf die Proteinmenge zurück gerechnet (10 µg entsprachen bei der hier verwendeten Anlage und Säule 280 area [min*mAU], siehe 2.14.1). Mithilfe dieser Rückrechnung konnte die Proteinmenge der aufgefangenen Proben bestimmt werden. Die lyophilisierten Proben wurden nun in der entsprechenden Menge H₂O aufgenommen um eine Proteinkonzentration von 1 µg/µl zu erreichen und sie so in Mengen von 50 bzw. 100 µg abzufüllen. Diese wurden im Anschluss zur Vorbereitung auf die antimikrobielle Testung erneut bei -80 °C eingefroren, danach lyophilisiert und bei -20 °C gelagert.

2.13.6 Präparation des Peptidfragments FLG₁₆₂₋₁₈₄

Dieses Peptidfragment wurde synthetisch im Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig hergestellt und lag lyophilisiert vor. Zunächst wurden 4 mg abgewogen und in 400 µl H₂O aufgenommen. Für die Reinheitsbestimmung, sowie für die Bestimmung der Konzentration, wurden auch hier zwei Läufe (5 µl, 10 µl) mit der C18-Umkehrphasen-HPLC durchgeführt (Jupiter 5U C18 300Å, 150 x 2 mm). Auch hiervon wurden Proben massenspektrometrisch getestet. Mithilfe der Fläche der Peaks (10µg entsprechen bei der hier verwendeten Anlage und Säule 224,3 area [min*mAU]) wurde die Proteinmenge bestimmt und der Mittelwert beider Ergebnisse gebildet. Mithilfe dieser Rückrechnung konnten mehrere Proben entsprechend 50 µg Protein abgefüllt werden. Diese wurden bei -80 °C eingefroren und zur Vorbereitung für die antimikrobielle Testung lyophilisiert.

2.14 Proteinanalytik

2.14.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Um die Proteinkonzentration vor der Bromcyan-Spaltung zu bestimmen, wurde ein Einstrahlphotometer genutzt (NanoDrop 1000 Spectrophotometer), welches die Absorption von Proteinen bei Wellenlängen von 220 - 750 nm misst.

Es ist aufgebaut aus zwei Faseroptiken, zwischen die 1 µl der zu analysierenden Substanz aufgetragen wird. Eine Xenonlampe dient als Lichtquelle und der Sensor eines Photometers misst die Lichtextinktion, nachdem das Licht die Probe passiert hat. Die Messung des Referenzwertes und der Probe erfolgen nacheinander.

Die Konzentration der Proteine wird dann vom Photometer auf der Basis des Lambert-Beer'schen Gesetzes ($E=c \times d \times \epsilon$; E = gemessene Extinktion, c = molare Konzentration [M],

d = Schichtdicke des durchstrahlten Körpers [cm], ϵ = molarer Extinktionskoeffizient [$\text{l/mol} \times \text{cm}$]) berechnet. Dieses besagt, dass die Lichtextinktion bei einer bestimmten Wellenlänge proportional zur Konzentration des gemessenen Stoffes ist, wenn die Schichtdicke konstant bleibt. Der molare Extinktionskoeffizient ist ein Maß dafür, wie viel elektromagnetische Strahlung eine Substanz bei einer bestimmten Wellenlänge und Durchtrittslänge absorbiert. Er ist für jede Substanz spezifisch und bei Proteinen abhängig von dem Vorhandensein der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, sowie von der Anzahl an Disulfid-Brücken.

Eine weitere Methode die Konzentration von Proteinen zu berechnen, gewährt die HPLC. Beispielsweise können so, wie im hier vorliegenden Fall, auch Konzentrationen für Proteine, bei denen die photometrische Messung nicht möglich ist, gemessen werden. Hierbei wird eine kleine Menge der Probe über eine HPLC-Säule gegeben. Am entstandenen Chromatogramm lassen sich die Flächen unterhalb der einzelnen Peaks ("Area under the curve", $[\text{min} \times \text{mAU}]$) ablesen. Mittels dieser Werte und der „Area“ einer Standardlösung lässt sich die Proteinkonzentration der Lösung innerhalb des Peaks berechnen.

2.14.2 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren, mit dem die Massen von Atomen oder Molekülen ermittelt werden können. Die zu untersuchende Substanz bezeichnet man als Analyt. Dieser wird mit Hilfe einer Ionenquelle ionisiert, durch ein elektrisches Feld beschleunigt und am Ende dem Analysator zugeführt. Hier werden die Ionen nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis $[m/z]$ getrennt. Im Detektor werden letztendlich die separierten Ionen erfasst, verstärkt und in einem Histogramm dargestellt.

Die Detektion der Masse der pE-SUMO3-FLG₁₆₂₋₂₀₇- und pE-SUMO3-FLG₁₇₆₋₂₀₇-Fusionsproteine, sowie der rekombinanten FLG₁₆₂₋₂₀₇- und FLG₁₇₆₋₂₀₇-Proteine erfolgte mithilfe der Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie an einem Quadrupol-Time-of-Flight-Hybrid-Massenspektrometer (QTOF II), im Positiv-Ionen-Modus.

Mithilfe der „MassLynx-Software“ konnten die so erstellten Rohdaten ausgewertet werden. Sie wurden hierbei Hintergrund-korrigiert und die Durchschnittsproteinmassen wurden durch „Maximum Entropy 1“ (MaxEnt1) berechnet.

2.15 Antimikrobielle Testverfahren

Die rekombinant hergestellten Proteine FLG₁₆₂₋₂₀₇ und FLG₁₇₆₋₂₀₇, sowie das synthetisch hergestellte FLG₁₆₂₋₁₈₄, wurden mit Hilfe des radialen Plattendiffusionstests auf vorhandene antimikrobielle Eigenschaften untersucht. Als Testmikroorganismen wurden der Gram-positive Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, die Gram-negativen Stämme *Escherichia coli* ATCC 11303 und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, sowie die Hefe *Candida albicans* ATCC 24433 gewählt. Die antimikrobielle Testung wurde im Institut für Infektionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel durchgeführt.

Zur Vorbereitung dieses antimikrobiellen Tests wurden zunächst 8 ml TSB-Medium mit den verschiedenen Mikroorganismen versetzt und bei 37 °C und 120 rpm über Nacht im Schüttler inkubiert. Von der Übernachtskultur wurden stammabhängig verschiedene Mengen in 8 ml TSB-Medium gegeben (siehe Tab. 2.5) und 2-2,5 Stunden als Stand- (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) bzw. Schüttelkultur (*Candida albicans*) inkubiert.

Tab. 2.5: Kultivierung der Mikroorganismen im radialen Plattendiffusionstest

Organismus	Volumen aus Übernachtskultur [µl]	Volumen in 10 ml Underlay-Agarose [µl]
<i>Escherichia coli</i>	50	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50	50
<i>Staphylococcus aureus</i>	100	100
<i>Candida albicans</i>	200	200

Im Folgenden wurden 10 ml Underlay-Agarose mit der jeweiligen Bakteriensuspension vermischt (siehe Tab. 2.5), in Petrischalen gegossen und 15 min bei Raumtemperatur und 30 min im Kühlschrank abkühlen lassen. Mit einer Hautstanze wurden in die ausgehärtete Agarose 3 mm große Löcher gestanzt, in welche 5 µl der zuvor in 0,01 % Essigsäure gelösten Testlösungen in verschiedenen Verdünnungen (unverdünnt, 1:3, 1:10, 1:30, 1:100) gegeben wurden. Die Petrischalen wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Als Positivkontrolle diente humanes Lysozym, welches bekanntermaßen eine antimikrobielle Wirkung auf die genutzten Testorganismen besitzt. Als Negativ-Kontrolle wurde 0,01 % Essigsäure verwendet.

Am nächsten Tag wurden 10 ml Overlay-Agarose, als zusätzliche Nahrung für die Bakterien, in die Petrischalen gegossen und für weitere 3-4 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Das Prinzip dieses Tests beruht darauf, dass die Testlösungen radial in die Agarose diffundieren. Sollte eine antimikrobielle Aktivität vorliegen, entstehen sogenannte Hemmhöfe, welche am Ende ausgemessen werden. Diese zeigen an, dass die Bakterien dort, gehemmt durch die zu testende Substanz, nicht weiter wachsen konnten. Berechnet aus der Größe der Hemmhöfe bei verschiedenen Konzentrationen der Substanzen kann die MEK (minimale effektive Konzentration) als Maß für eine antimikrobielle Aktivität angegeben werden.

Der radiale Plattendiffusionstest wurde in Anlehnung an Steinberg und Lehrer, 1997, durchgeführt und ausgewertet.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die N-terminal gelegenen Fragmente FLG₁₆₂₋₂₀₇ und FLG₁₇₆₋₂₀₇ des epidermalen „S100 Fused Type“-Proteins Profilaggrin rekombinant hergestellt, aufgereinigt und hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Eigenschaften untersucht werden. Ein weiteres Fragment (FLG_{162,184}) wurde synthetisch hergestellt und ebenso der antimikrobiellen Testung unterzogen. In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits in verschiedenen Proteinfragmenten dieser Familie antimikrobielle Eigenschaften nachgewiesen, wie in Hornerin oder Filaggrin-2, ebenso wie für Fragmente des Profilaggrin. In den Dissertationen von D. Karsch und Ch. Schulz wurden große Fragmente des N-Terminus untersucht und einer antimikrobiellen Testung unterzogen, wobei zwei der vier getesteten Fragmente antimikrobielle Aktivität zeigten. Um die für diese Aktivität ursächlichen Regionen weiter einzugrenzen und nähere Erkenntnisse über den Ursprungsort der antimikrobiellen Wirksamkeit zu erlangen, wurden die in der vorliegenden Arbeit untersuchten kleineren Fragmente ausgewählt. Diese sind Teilstücke aus bereits getesteten aktiven Fragmenten (siehe Abb. 4.1). Eine Übersicht der durch unsere Arbeitsgruppe bereits getesteten Profilaggrin-Fragmente ist im Anhang dargestellt (siehe 6.1).

3.1 Amplifizierung der Profilaggrin-Fragmente

Um die Fragmente herzustellen, wurde zunächst mit den Sequenz-spezifischen Primern FLG-162-f und FLG-176-f, sowie FLG-207-r und humaner genomischer DNA eine modifizierte Standard-PCR durchgeführt (siehe 2.11.1.1). Die beiden daraus entstandenen DNA-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 2.11.2) und mittels UV-Licht sichtbar gemacht (siehe Abb. 3.1 A).

Die Fragmente basierten auf einer ungefähren Größe zwischen 100 und 200 bp, was den theoretischen Größen der Fragmente entsprach (FLG₁₆₂₋₂₀₇: 166 bp; FLG₁₇₆₋₂₀₇: 124 bp). Die detektierten Banden wurden aus dem Gel herausgeschnitten und die DNA mittels GeneJET Gel Extraction Kit in 30 µl Tris-HCl (10 mM, pH 8,5) eluiert (siehe 2.11.3). Das Fragment FLG₁₆₂₋₁₈₄ wurde im Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig synthetisch hergestellt und später für die chromatographische Aufreinigung und antimikrobielle Testung genutzt.

Da nach der modifizierten Standard-PCR auch in den Spalten mit den Negativkontrollen Banden der richtigen Größe zu sehen waren, wurde die PCR mit den Negativkontrollen wiederholt (siehe Abb. 3.1 B). In der darauf folgenden Elektrophorese konnte man lediglich Primerwolken erkennen und somit eine eventuelle Verunreinigung ausschließen.

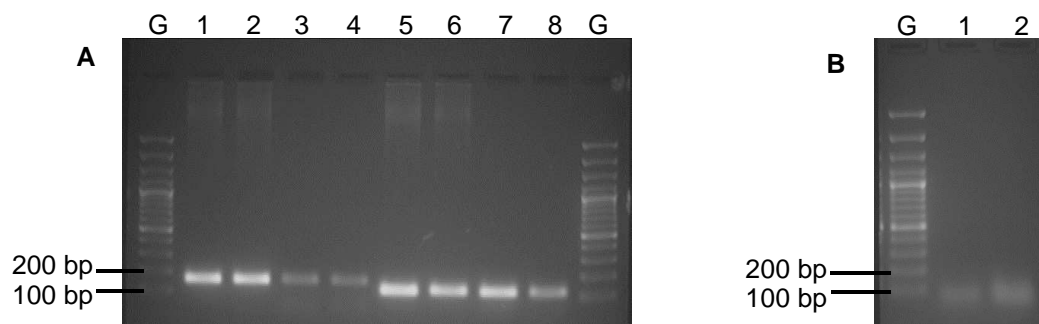


Abb. 3.1: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit den Produkten der Standard-PCR.

A: Zu sehen sind die Profilaggrin-Fragmente FLG₁₆₂₋₂₀₇ (PCR-Produkt verteilt auf Spur 1 und 2) bei 166 bp und FLG₁₇₆₋₂₀₇ (verteilt auf Spur 5 und 6) bei 124 bp, sowie die jeweiligen Negativkontrollen (Spur 3 und 4 für FLG₁₆₂₋₂₀₇, Spur 7 und 8 für FLG₁₇₆₋₂₀₇), G: Gene Ruler 100 bp Plus DNA-Ladder.

B: Erneute PCR der Negativkontrollen. Spur 1: FLG₁₆₂₋₂₀₇, Spur 2: FLG₁₇₆₋₂₀₇, G: Gene Ruler 100 bp Plus DNA-Ladder. In Spur 1 und 2 sind lediglich Primerwolken zu sehen.

3.2 Klonierung im pJet1.2-Vektorsystem

Vor der Expression im pE-SUMO3-System wurden die Fragmente FLG₁₆₂₋₂₀₇ und FLG₁₇₆₋₂₀₇ zur weiteren Vervielfältigung in den pJet1.2-Vektor ligiert (siehe 2.11.4) und im Anschluss in *E. coli* XL1Blue-Zellen transformiert (siehe 2.11.5).

Nach einstündiger Inkubation, schüttelnd bei 37 °C, wurden die Transformationsprodukte auf LB-Agar ausplattiert, welcher Ampicillin (100 µg/ml) und Tetracyclin (12,5 µg/ml) enthielt, da der pJet1.2-Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen beinhaltet, die Bakterien eines gegen Tetracyclin. Somit konnten nur die Bakterien überleben, welche den Vektor aufgenommen haben und dadurch über beide Resistenzen verfügten. Nach der Kultivierung über Nacht wurden jeweils fünf Einzelkolonien ausgewählt und mit Hilfe einer Colony-Check-PCR (siehe 2.11.1.2) überprüft. Durch die Verwendung zweier Primer (pJet1.2F bzw. pJet1.2R), die ca. 60 bp vor und hinter dem Insert in der „Multiple Cloning Site“ des pJet1.2-Vektors binden, konnte anhand der Fragmentgröße ermittelt werden, ob der Vektor die jeweiligen Inserts aufgenommen hat (Fragmentgröße + 120 bp). Im 1%igen Agarose-Gel waren für das Fragment FLG₁₆₂₋₂₀₇ deutliche Banden bei etwa 300 bp erkennbar (Fragmentgröße 286 bp) und für das Fragment FLG₁₇₆₋₂₀₇ bei etwa 250 bp (Fragmentgröße 244 bp).

Anhand dieser Ergebnisse wurden zwei positiv getestete Kolonien ausgewählt und in 3 ml LB-Flüssigmedium mit Ampicillin (100 µg/ml) und Tetracyclin (12,5 µg/ml) bei 37 °C über Nacht im Schüttler inkubiert. Es folgte eine Plasmidpräparation (siehe 2.11.6) und eine Restriktionshydrolyse mit *Xba*I und *Bsa*I (siehe 2.11.7). Da beide Profilaggrin-Fragmente durch die speziellen Primer in der PCR jeweils am Anfang und am Ende ihrer Sequenz eine Schnittstelle für *Bsa*I und *Xba*I erhalten haben, konnten sie hier durch die Behandlung mit

3 Ergebnisse

eben diesen Enzymen spezifisch aus dem Vektor herausgeschnitten werden.

Die Profilaggrin-Fragmente lagen somit wieder isoliert vor und konnten im nächsten Schritt elektrophoretisch in einem 1,2%igen Agarose-Gel vom pJet1.2-Vektor getrennt werden.

In Abb.3.2 erkennt man doppelt geschnittene Fragmente, sowie einzeln mit *XbaI* bzw. *BsaI* geschnittene Fragmente. Hiermit sollte zusätzlich die Funktion der Restriktionsenzyme überprüft werden. Eine Übersicht über die entstandenen Fragmente findet sich in Tab. 3.1.

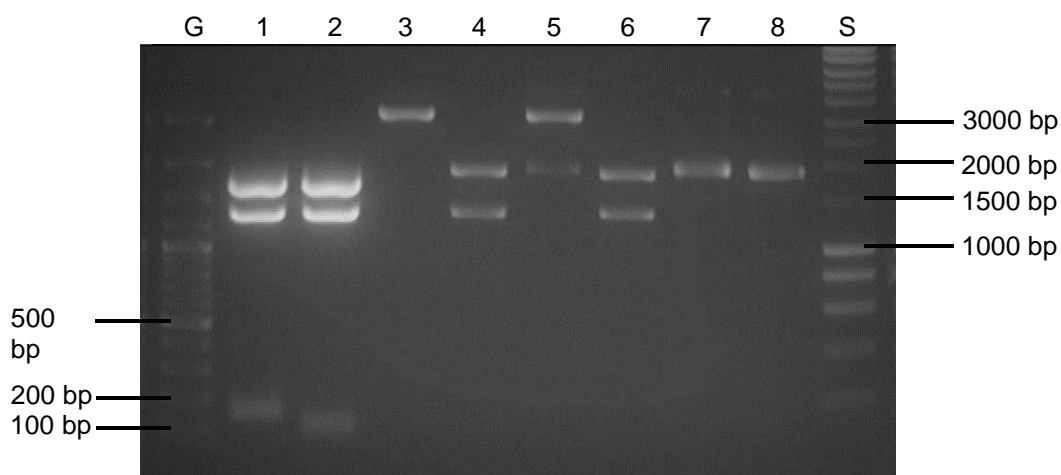


Abb 3.2: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsverdaus mit *XbaI* und *BsaI*. Spur 1: FLG₁₆₂₋₂₀₇ mit *BsaI* und *XbaI* geschnitten, Spur 2: FLG₁₇₆₋₂₀₇ mit *BsaI* und *XbaI* geschnitten, Spur 3: FLG₁₆₂₋₂₀₇ mit *XbaI* geschnitten, Spur 4: FLG₁₆₂₋₂₀₇ mit *BsaI* geschnitten, Spur 5: FLG₁₇₆₋₂₀₇ mit *XbaI* geschnitten, Spur 6: FLG₁₇₆₋₂₀₇ mit *BsaI* geschnitten, Spur 7 und 8: Negativkontrollen, G: Gene Ruler 100 bp Plus DNA-Ladder, S: 1 kb DNA Smart Ladder.

Tab.3.1: Übersicht über die zu erwartenden Fragmente nach der Restriktionshydrolyse

Restriktionshydrolyse mit Enzym	<i>XbaI</i>	<i>BsaI</i>	<i>XbaI</i> und <i>BsaI</i>
	3140 bp (FLG ₁₆₂₋₂₀₇ verbunden mit Vektor) bzw. 3098 bp (FLG ₁₇₆₋₂₀₇ verbunden mit Vektor)	1289 bp (Vektorfragment) und 1851 bp (FLG ₁₆₂₋₂₀₇ verbunden mit Vektor) bzw. 1809 bp (FLG ₁₇₆₋₂₀₇ verbunden mit Vektor)	166 bp (FLG ₁₆₂₋₂₀₇), 124 bp (FLG ₁₇₆₋₂₀₇), 1685 bp und 1289 bp (pJet1.2-Vektor)

3 Ergebnisse

In Abb. 3.3 ist die Vektorkarte des pJet1.2-Vektors zu erkennen. In dieser wurden die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme markiert, sowie die Größen der entstehenden Fragmente.

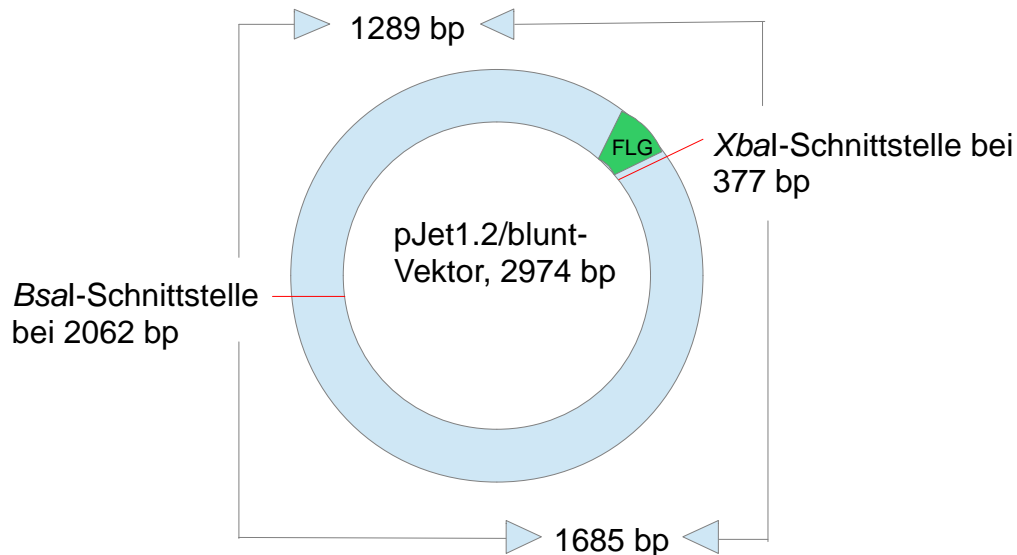


Abb. 3.3: Vektorkarte des pJet1.2/blunt-Vektors mit den Schnittstellen für *BsaI* und *XbaI*.

Auch der pE-SUMO3-Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym *BsaI* geschnitten und mit Hilfe eines 0,8%igen Agarose-Gels von ungeschnittenen Vektoranteilen getrennt (siehe 2.11.7). Da *BsaI* außerhalb seiner Erkennungssequenz an zwei unterschiedlichen Schnittstellen schneidet, konnten hier mit nur einem Restriktionsenzym zwei unterschiedliche Überhänge generiert werden, die komplementär zu denen der Inserts waren.

Im Anschluss wurden die mit *XbaI* und *BsaI* behandelten Fragmente, sowie der linearisierte pE-SUMO3-Vektor aus den Agarose-Gelen ausgeschnitten und mittels GeneJET Gel-Extraction-Kit aufgereinigt.

3.3 Klonierung im pE-SUMO3-Vektorsystem

3.3.1 Ligation und Transformation in *E. coli* XL1-Blue-Zellen

Für die Expression wurden die hergestellten Profilaggrin-Fragmente in den pE-SUMO3-Vektor ligiert (siehe 2.11.4). Im Anschluss erfolgte die Transformation in *E. coli* XL1-Blue-Zellen (siehe 2.11.5). Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C im Schüttler wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten ausplattiert, welche Tetracyclin (12,5 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) enthielten.

Am folgenden Tag wurde mit jeweils zehn ausgewählten Einzelkolonien eine Colony-Check-PCR durchgeführt. Hierfür wurden als Forward-Primer des jeweiligen Inserts genutzt und als Reverse-Primer der T7-Reverse-Primer, welcher 140 bp hinter dem Insert auf dem pE-SUMO3-Vektor bindet. Die Proben wurden auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen und durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt. Es wurde bei allen Proben eine deutliche Bande bei 300 bp (FLG₁₆₂₋₂₀₇ = 166 bp und 140 bp des Vektors) bzw. 250 bp (FLG₁₇₆₋₂₀₇ = 124 bp und 140 bp des Vektors) ersichtlich.

Es wurden jeweils zwei Kolonien ausgewählt und in 3 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika Tetracyclin (12,5 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Es folgte eine Plasmidpräparation am nächsten Tag.

Um die Sequenz der Inserts zu überprüfen wurde im Institut für klinische Molekularbiologie der Universitätsklinik Schleswig-Holstein in Kiel eine Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese durchgeführt (siehe 2.11.8).

3.3.2 Transformation in *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen

Die auf ihre korrekte Sequenz hin überprüfte DNA wurden im Anschluss in *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen transformiert. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C im Schüttler wurden jeweils 100 µl der Transformationsprodukte auf LB-Agar ausplattiert, welcher die entsprechenden Antibiotika enthielt. In der darauf folgenden Colony-Check-PCR mit den jeweiligen Forward-Primern und dem T7-Reverse-Primer, wurde noch einmal überprüft, ob die Bakterien die Plasmide aufgenommen haben.

Zur Vorbereitung der Expression wurden 20 ml LB-Medium in vier Kolben mit Chloramphenicol (34 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) versetzt und mit je einer Kolonie angeimpft (zwei pro Fragment). Alle vier Kolben wurden über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert.

3.4 Expression der Fusionsproteine

Aus den jeweils zwei angesetzten Flüssigkulturen wurde je eine für die Expression ausgewählt. Diese Flüssigkulturen wurden genutzt, um mit Hilfe ihrer gemessenen OD₆₀₀ jeweils drei Kolben mit 250 ml LB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,08 anzuimpfen. Das Medium wurde zuvor mit Chloramphenicol (34 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) versetzt (siehe 2.12.2). Nach zweistündiger Inkubation im Schüttler bei 37 °C wurde eine OD₆₀₀ von 0,5-0,6 erreicht, welche für die Induktion mit IPTG nötig ist. Nach der Induktion und weiteren drei Stunden Inkubation unter oben genannten Bedingungen wurden die Kulturen 10 min bei 6000 x g zentrifugiert, die Bakterienpellets mit je 3 ml NPI-20 aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

Durch die anschließende Behandlung mit dem Ultraschallgerät wurden die Bakterien lysiert. Die darauf folgende Zentrifugation separiert die pelletierbaren Bestandteile dieser Suspension, also die Zelltrümmer der Bakterien von den löslichen Bestandteilen, also den bakteriellen Proteinen, sowie den Fusionsproteinen im Überstand. (siehe 2.13.1).

3.5 Aufreinigung der Fusionsproteine

Im ersten Schritt der Aufreinigung wurden die gewonnenen Fusionsproteinproben mittels immobilisierter Metallionenaffinitätschromatographie von den bakteriellen Proteinen getrennt (siehe 2.13.2).

In Abb. 3.4 ist ein Chromatogramm der immobilisierten Metallionenaffinitätschromatographie am Beispiel des pE-SUMO3-FLG₁₆₂₋₂₀₇-Fusionsproteins zu sehen. Der erste sichtbare Peak ist auf die Elution der nicht an die Säulenmatrix bindenden bakteriellen Proteine zurückzuführen. Nach ca. 17 ml Durchflussvolumen wurde das Fusionprotein pE-SUMO3-FLG₁₆₂₋₂₀₇ eluiert.

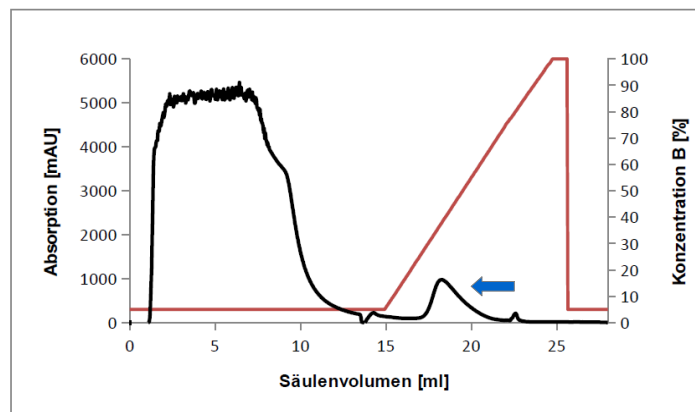


Abb. 3.4: Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie des pE-SUMO3-FLG₁₆₂₋₂₀₇-Fusionsproteins. Die relative Absorption [mAU] bei 280 nm (schwarze Linie) wurde im Gradientenverlauf (rote Linie) gegen das Säulenvolumen [ml] aufgetragen. Die rechte Skala zeigt die Konzentration der Elutionslösung B [%]. Der Peak des Fusionsproteins ist mit einem Pfeil markiert.

Das aufgefangene Eluat wurde im Anschluss einer Größenausschlusschromatographie zugeführt (siehe 2.13.2), bei der die enthaltenen Substanzen nach Größe getrennt werden konnten. Als Laufmittel wurde H₂O verwendet.

In Abb. 3.5 ist ein Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie am Beispiel des pE-SUMO3-FLG₁₆₂₋₂₀₇-Fusionsproteins zu sehen. Die aufgefangene Fraktion (grüner Pfeil) wurde direkt im Massenspektrometer untersucht.

Für das pE-SUMO3-FLG₁₇₆₋₂₀₇-Fusionsprotein wurde ebenso verfahren.

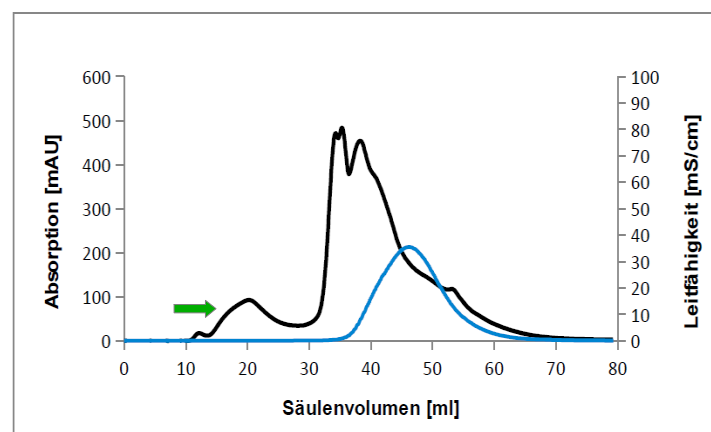


Abb. 3.5: Größenausschlusschromatographie des pE-SUMO3-FLG₁₆₂₋₂₀₇-Fusionsproteins. Die relative Absorption [mAU] bei 280 nm (schwarze Linie) wurde gegen das Säulenvolumen [ml] aufgetragen. Die rechte Skala zeigt die Leitfähigkeit [mS/cm]. Die markierte Fraktion (grüner Pfeil) wurde ausgewählt, um sie im nächsten Schritt der Spaltung mittels Bromcyan zuzuführen.

3 Ergebnisse

Um diese Proben, auf Vorhandensein der Fusionsproteine zu prüfen, wurden massenspektrometrische Untersuchungen der aufgefangenen Proben vorgenommen, in welchen die gewünschten Proteine nachgewiesen werden konnten. In Abb. 3.6 ist ein Massenspektrum des pE-SUMO3-FLG₁₆₂₋₂₀₇ zu sehen. Das stärkste Signal zeigte die Masse von 17225,0 Da. Dies stimmte mit der errechneten Masse von 17225,0 Da überein.

In dem Massenspektrum des pE-SUMO3-FLG₁₇₆₋₂₀₇ lag das stärkste Signal bei einer Masse von 15562,1 Da, was mit der errechneten Masse von 15562,3 Da ebenfalls nahezu übereinstimmte.

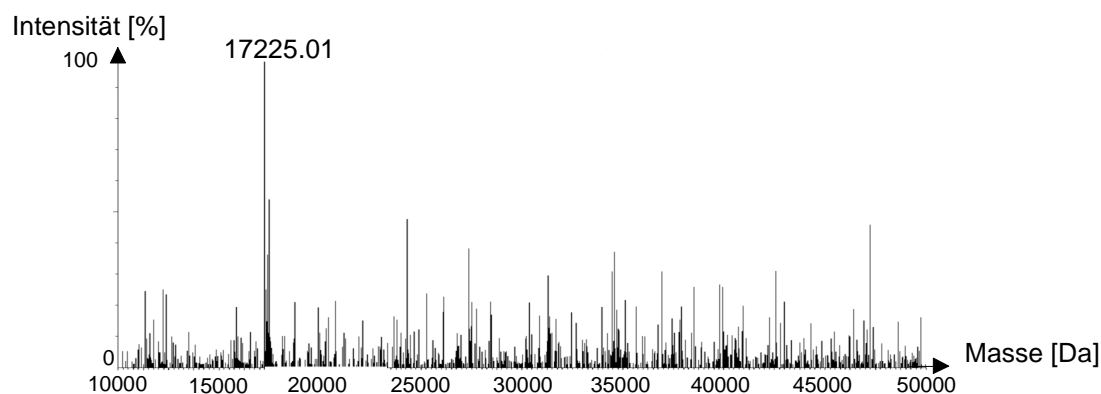


Abb. 3.6: Massenspektrum des pE-SUMO3-FLG₁₆₂₋₂₀₇.

Die Masse in Dalton wurde hier gegen die Intensität in Prozent aufgetragen und zeigte das stärkste Signal bei 17225,01 Da. Die errechnete Masse des Proteins betrug 17225,0 Da.

3.6 Aufreinigung der rekombinanten Profilaggrin-Fragmente

3.6.1 Aufreinigung der Fusionsproteine pE-SUMO3-FLG₁₆₂₋₂₀₇ und -FLG₁₇₆₋₂₀₇

Um die rekombinanten Proteine von den Fusionstags des pE-SUMO3-Systems zu trennen, wurde eine Spaltung mittels Bromcyan vorgenommen (siehe 2.13.4). Dieses spaltet C-terminal von Methioninen. In den hier zu trennenden Fusionsproteinen befanden sich je drei Methionine in der pE-SUMO3-Tag-Sequenz, zusätzlich zu dem direkt N-terminal vor der FLG-Sequenz mittels Primer eingefügten, wodurch nach der Spaltung das gewünschte Protein, sowie mehrere Fragmente des Fusionstags vorlagen.

Pro Fusionsprotein wurden je 3000 µg Protein gespalten (siehe 2.13.4).

Im Anschluss wurden je 300 µg der Proteinproben abgenommen, um anhand einer Jupiter 5U C18 300Å-(150 x 2 mm)-Trennsäule zu ermitteln, ob sich die einzelnen Bestandteile trennen ließen (siehe 2.13.5). Hierbei zeigte sich eine gute Abtrennung des Zielproteins von den SUMOtag-Bestandteilen, sodass mit einem optimierten Gradienten und einer

3 Ergebnisse

Jupiter 5U C18 300Å (150 x 4,6 mm) -Trennsäule die verbliebenen Proteinproben in größerem Maßstab aufgetrennt werden konnten. Dabei trennten sich die rekombinanten Proteine von den Fusionstag-Bestandteilen ab. In Abb. 3.7 ist ein Chromatogramm der C18-Umkehrphasen-HPLC am Beispiel des FLG₁₆₂₋₂₀₇-Proteins zu sehen. Diese Proteine wurden nach ca. 15 min von der Trennsäule eluiert, danach folgten bei ca. 20 min die Bestandteile des Fusionstags. Das Chromatogramm des FLG₁₇₆₋₂₀₇ zeigte ähnliche Retentionszeiten.

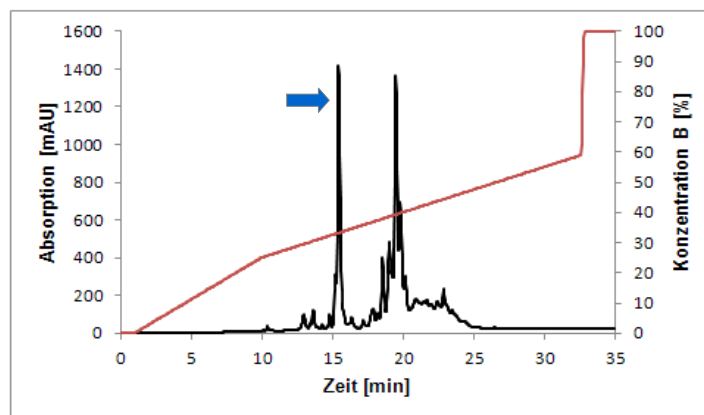


Abb. 3.7: Chromatogramm einer C18-Umkehrphasenchromatographie des vom Fusionstag gespaltenen FLG₁₆₂₋₂₀₇-Proteins. Die relative Absorption [mAU] bei 215 nm (schwarze Linie) wurde im Gradientenverlauf (rote Linie) gegen die Zeit [min] aufgetragen. Die rechte Skala zeigt die Konzentration der Elutionslösung B [%]. Der erste Peak stellt die Elution des Proteins dar (blauer Pfeil), während die darauf folgenden Peaks durch die Bestandteile des Fusionstags hervorgerufen werden.

In der nachfolgenden massenspektrometrischen Messung der Fraktionen der C18 Umkehrphasen-HPLC ergab sich für das FLG₁₆₂₋₂₀₇-Protein eine Masse von 5539,9 Da. Dies stellte einen Unterschied von 0,1 Da zu der errechneten Masse von 5540,0 Da dar. Die Messung des FLG₁₇₆₋₂₀₇-Proteins ergab eine Masse von 3878,0 Da, was der errechneten Masse von 3877,7 Da ebenfalls nahezu entsprach. In Abb. 3.8 ist ein repräsentatives Massenspektrum am Beispiel des FLG₁₆₂₋₂₀₇-Proteins zu sehen.

3 Ergebnisse

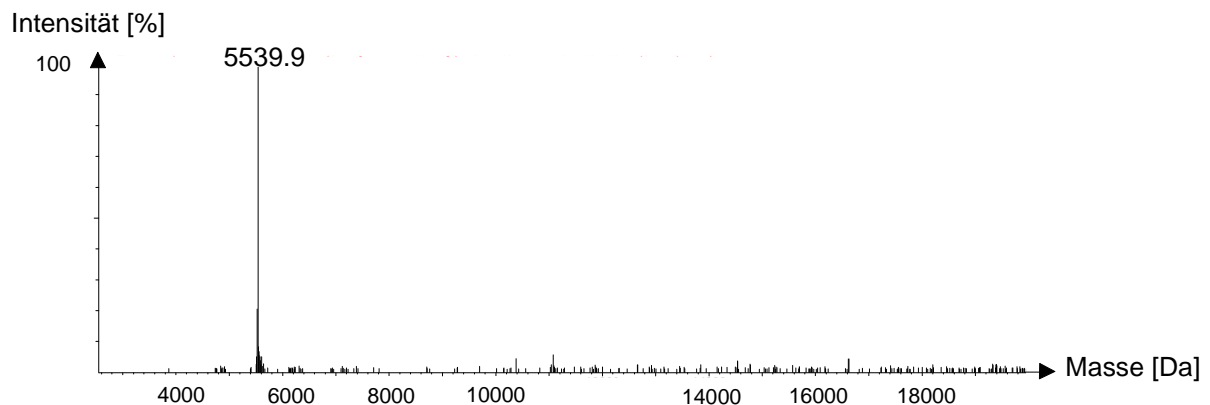


Abb. 3.8: Massenspektrum des Profilaggrin-Proteins FLG₁₆₂₋₂₀₇ nach Bromcyan-Spaltung und Aufreinigung mittels C18-Umkehrphasen-HPLC.

Die Masse in Dalton wurde hier gegen die Intensität in Prozent aufgetragen und zeigte das stärkste Signal bei 5539,9 Da. Die errechnete Masse des Proteins betrug 5540,0 Da.

Die auf das jeweilige Protein hin positiv getesteten Fraktionen wurden gepoolt.

Im letzten Schritt erfolgten zwei weitere Läufe mit kleinen Proteinmengen (5 µl, 10 µl) der gepoolten Fraktionen der C18-Umkehrphasen-HPLC. Diese Läufe wurden mit der Jupiter 5U C18 300Å-(150 x 2 mm)-Trennsäule durchgeführt, um anhand der Fläche („Area under the curve“) der einzelnen Peaks, die jeweilige Proteinmenge zu berechnen (10 µg entsprachen bei der hier verwendeten Anlage und Säule 280 area [min*mAU], siehe 2.14.1), da eine photometrische Messung mittels NanoDrop aufgrund der fehlenden, bzw. nur in geringem Maße vorhandenen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan nicht möglich war. Ein repräsentatives Chromatogramm ist in Abb. 3.9 gezeigt (FLG₁₆₂₋₂₀₇).

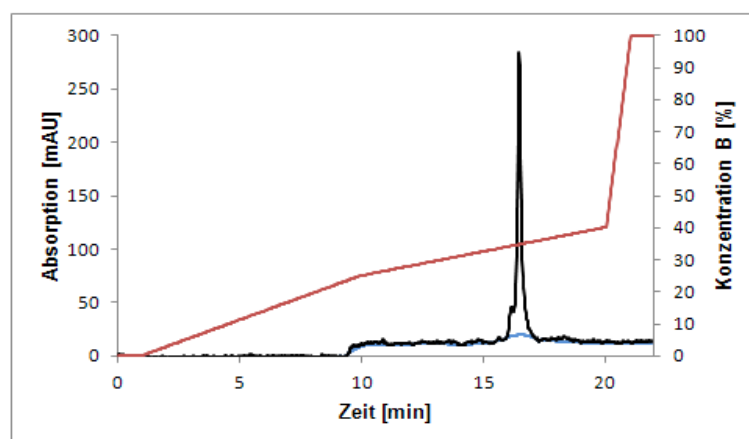


Abb. 3.9: Chromatogramm der C18-Umkehrphasenchromatographie des FLG₁₆₂₋₂₀₇-Proteins zur Berechnung der Proteinmenge. Die relative Absorption [mAU] bei 215 nm (schwarze Linie) wurde im Gradientenverlauf (rote Linie) gegen die Zeit [min] aufgetragen. Die rechte Skala zeigt die Konzentration der Elutionslösung B [%]. Um eine genauere Berechnung der „area under the curve“ zu ermöglichen, wurde eine korrigierte Baseline eingefügt (blaue Linie).

3 Ergebnisse

Der Rest der gepoolten Fraktionen wurde in der Vakuumzentrifuge zunächst eingengt, anschließend lyophilisiert und bei -20 °C gelagert.

Nachdem die Proteinmengen ermittelt wurden, konnten die lyophilisierten Proben mit der entsprechenden Menge H₂O aufgenommen werden, um zur Vorbereitung für die antimikrobielle Testung die gewünschte Proteinkonzentration in der Lösung zu erhalten und diese in Mengen von 50 bzw. 100 µl abzufüllen. Danach erfolgte erneut die Lyophilisierung zur Lagerung.

3.6.2 Präparation des Peptidfragments FLG₁₆₂₋₁₈₄

Dieses Profilaggrin-Fragment wurde synthetisch hergestellt und lag lyophilisiert vor. Es wurden 4 mg abgewogen und in 400 µl H₂O aufgenommen (siehe 2.13.6).

Auch mit diesem Fragment wurden zwei Durchgänge (5 µl, 10 µl) mit der Jupiter 5U C18 300Å-(150 x 2 mm)-Trennsäule durchgeführt, um zum einen dessen Reinheit zu überprüfen und zum anderen auch hier die genaue Proteinmenge zu bestimmen (10 µg entsprachen in der hier verwendeten Anlage und Säule 224,3 area [min*mAU]).

Auch hier folge die Lyophilisierung in Vorbereitung auf die mikrobiologische Testung.

In Abb. 3.10 ist ein Chromatogramm des FLG₁₆₂₋₁₈₄-Proteins dargestellt. Abb. 3.11 zeigt das Massenspektrum dieses Proteins.

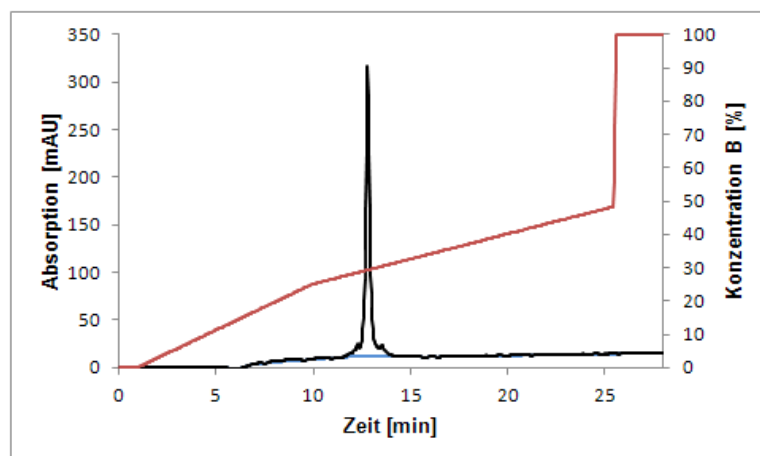


Abb. 3.10: Chromatogramm der C18-Umkehrphasenchromatographie des FLG₁₆₂₋₁₈₄-Proteins zur Berechnung der Proteinmenge. Die relative Absorption [mAU] bei 215 nm (schwarze Linie) wurde im Gradientenverlauf (rote Linie) gegen die Zeit [min] aufgetragen. Die rechte Skala zeigt die Konzentration der Elutionslösung B [%]. Um eine genauere Berechnung der „area under the curve“ zu ermöglichen, wurde eine korrigierte Baseline eingefügt (blaue Linie).

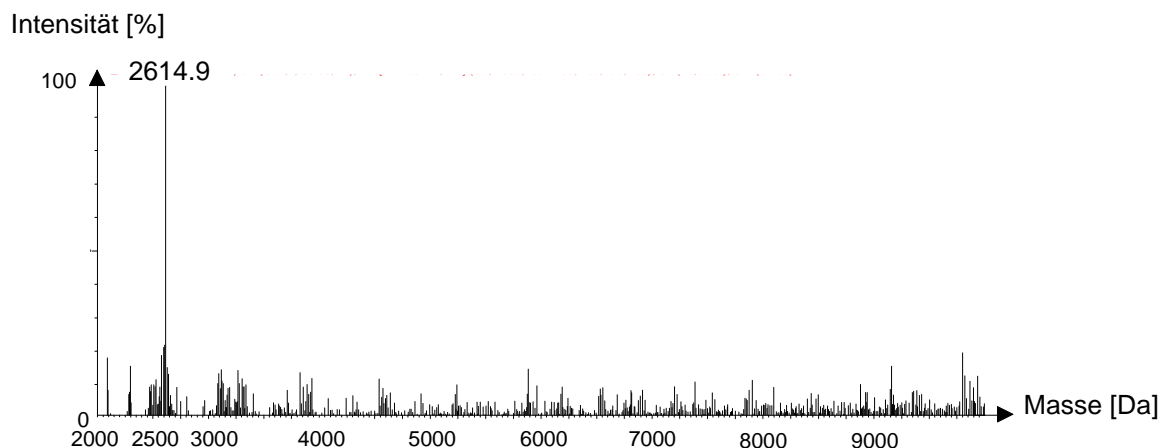


Abb. 3.11: Massenspektrum des Profilaggrin-Proteins FLG₁₆₂₋₁₈₄.

Die Masse in Dalton wurde hier gegen die Intensität in Prozent aufgetragen und zeigte das stärkste Signal bei 2614.9 Da. Die errechnete Masse des Proteins betrug 2613.7 Da.

3.7 Antimikrobielle Testung der Profilaggrin-Fragmente FLG₁₆₂₋₂₀₇, FLG₁₆₂₋₁₈₄ und FLG₁₇₆₋₂₀₇

Nach der Aufreinigung der rekombinanten Proteine erfolgte die mikrobiologische Testung auf antimikrobielle Aktivität erfolgen (siehe 2.15).

Die Proteinlösungen wurden in ausgestanzte Löcher von Agaroseplatten gegeben, welche die Testorganismen enthielten. Dabei handelte es sich um den gram-positiven Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, die gram-negativen Bakterienstämme *Escherichia coli* ATCC 11303 und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, sowie die Hefe *Candida albicans* ATCC 24433.

Um die individuelle Wirkschwelle ermitteln zu können, wurden die Proteinlösungen in verschiedenen Verdünnungen in die Stanzlöcher gegeben (unverdünnt, 1:3, 1:10, 1:30, 1:100), wobei unverdünnt eine Anfangskonzentration des Proteins von 1 mg/ml vorlag. Als Positiv-Kontrolle diente humanes Lysozym (100 ng/μl), als Negativkontrolle 0,01 % Essigsäure.

In der Auswertung des radialen Plattendiffusionstests konnte bei keinem der drei Proteine eine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden. In allen Verdünnungen waren keine Hemmhöfe sichtbar. Lediglich das antimikrobiell wirksame Lysozym zeigte klare Hemmhöfe. Dieser Test wurde pro Protein drei mal durchgeführt, wobei jeder das gleiche Ergebnis zeigte.

Im Anschluss wurde aufgrund der Überlegung, die Proteine könnten sich gegenseitig beeinflussen oder durch gegenseitige Komplettierung Aktivität erlangen, noch einmal der

3 Ergebnisse

radiale Plattendiffusionstest durchgeführt. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass N-terminal längere Fragmente antimikrobielle Aktivität zeigten, sodass angenommen werden konnte, dass ein Zusammenfügen dieser überlappenden Fragmente, einen positiven Effekt auf die antimikrobielle Wirksamkeit erziele. In diesem Versuch wurden die Proteinlösungen gemeinsam in die ausgestanzten Löcher der Agaroseplatten eingebracht. Auch hier wurde eine Verdünnungsreihe genutzt (unverdünnt, 1:3, 1:10, 1:30, 1:100), wobei unverdünnt eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml vorlag.

Bei der Auswertung dieser Versuchsreihen zeigte sich jedoch, dass in keiner der Verdünnungen ein Hemmhof sichtbar wurde. Auch hier konnte keine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden.

4 Diskussion

Die Vielzahl der sich heute im Handel befindlichen Penicilline und anderen Antibiotika schützt Millionen von Menschen seit vielen Jahren vor gefährlichen Folgen bakterieller Infektionen. Erkrankungen, wie z.B. Pneumonien, die noch vor hundert Jahren oft tödlich endeten, können zu Zeiten des Penicillins erfolgreich bekämpft werden .

Doch was passiert, wenn Bakterien Strategien entwickeln, die die Wirkmechanismen der herkömmlichen Antibiotika umgehen? Dies führt seit einigen Jahren zu größer werdenden Diskussionen, da man immer mehr multiresistente Keime findet, gegen welche sich die gängigen Antibiotika wirkungslos zeigen. Für die meisten Ärzte ist dies vor allem durch die großzügige Verschreibung von Antibiotika bedingt (Harbarth und Samore, 2005), welche oftmals fälschlicherweise auch bei Infektionen verordnet werden, die nicht auf eine bakterielle Ursache zurückzuführen sind . Besonders die Verwendung dieser Medikamente in der Primärversorgung von Infektionen, beispielsweise des Respirations- und Urogenitaltraktes, ist mit der Entwicklung zahlreicher Resistenzen assoziiert (Costelloe *et al.*, 2010). Diese stellen eine ernste Bedrohung der Gesundheit der Bevölkerung dar, welche zu erhöhten Kosten im Gesundheitswesen, verlängerter Liegedauer im Krankenhaus und Todesfällen führt (European Centre for Disease Prevention and Control., 2014). Umso wichtiger ist es, bekannte Antibiotika weiter zu entwickeln oder neue Wirkstoffe zu finden, welche antimikrobiell wirksam sind. Doch auch nach Alternativen zu herkömmlichen Antibiotika-Klassen wird gesucht (Zakeri und Lu, 2013).

Im Jahr 1987 fand M. Zasloff das antimikrobielle Peptid Magainin in der Haut des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* (Zasloff, 1987). Dieser Fund gab Grund zu Spekulationen, dass auch andere Wirbeltiere über eigene Antibiotika, sogenannte antimikrobiellen Peptide, in der Haut verfügen.

In den folgenden Jahren wurden viele Vertreter der antimikrobiellen Peptide beim Menschen gefunden, wie beispielsweise die humanen β -Defensine-1, -2 und -3 (Schulz, 2010), (Harder *et al.*, 1997, Harder *et al.*, 2001) das LL-37 (Frohm *et al.*, 1997) oder auch RNase7 (Harder und Schröder, 2002).

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit den antimikrobiellen Molekülen der Haut. Wie bereits in der Einleitung beschrieben (siehe 1.3), befinden sich im „epidermalen Differenzierungskomplex“ (1q21) die Gene zahlreicher Proteine, die an der epidermalen Differenzierung beteiligt sind. Unter anderem finden sich hier auch die Gene, die für die „S100 Fused Type“-Proteine kodieren. Zu dieser Proteinfamilie gehört auch Profilaggrin, welches Gegenstand der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen ist.

Das humane Profilaggrin hat zahlreiche Funktionen inne (siehe 1.1 und 1.2). Es ist ein Proprotein und wird während der epidermalen Differenzierung proteolytisch in einzelne Filaggrin-Monomere gespalten, welche eine Aggregation von Zytokeratinfilamenten hervorrufen (Steinert *et al.*, 1981). Dadurch entsteht die typische abgeflachte Form der Hornzellen im *Stratum corneum*. Des weiteren spielt es eine wichtige Rolle bei der Hydratation der Haut, da die Filaggrin-Monomere letztendlich in einzelne Aminosäuren und deren Derivate abgebaut werden und somit als „Natural Moisturizing Factors“ der Haut wirken und sie vor dem Austrocknen schützen (Kezic *et al.*, 2008).

In der Vergangenheit konnten außerdem bei HPLC-Analysen von Trypsin-verdauten Proteinextrakten des *Stratum corneum*, Fragmente aus der N-terminalen Region des Profilaggrins ausfindig gemacht werden, welche antimikrobielle Aktivität aufwiesen. Um die dafür ursächlichen Peptidsequenzen zu finden, wurden im Rahmen mehrerer Dissertationen unserer Arbeitsgruppe verschiedene Teilstücke des Profilaggrins rekombinant hergestellt und auf antimikrobielle Aktivität hin untersucht, wobei sich Sequenzen der B-Domäne des N-Terminus fanden, die antimikrobielle Aktivität aufwiesen (Schulz, 2010, Karsch, 2011). Nachfolgend wurden nun weitere Profilaggrin-Fragmente ausgewählt und getestet, um diese Sequenzen noch weiter einzugrenzen und die für die antimikrobielle Wirksamkeit ursächlichen Teilstücke ausfindig zu machen. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Profilaggrin-Fragmente umfassen die Aminosäuren 162-207, 162-184 und 176-207. Die beiden Fragmente FLG₁₆₂₋₂₀₇ und FLG₁₇₆₋₂₀₇ wurden rekombinant hergestellt und aufgereinigt. Das FLG₁₆₂₋₁₈₄ wurde synthetisch hergestellt und konnte direkt zur Testung genutzt werden. Die kodierende Sequenz dieses Fragments umfasst weniger als 100 Basenpaare, sodass dessen Aufreinigung sehr schwierig und aufwendig gewesen wäre. Zudem ist die synthetische Herstellung im Falle dieses Peptids insgesamt kostengünstiger als die rekombinante Herstellung.

Von humaner genomischer DNA wurden zunächst mit spezifischen Primern die kodierenden Sequenzen für die Peptidfragmente FLG₁₆₂₋₂₀₇ und FLG₁₇₆₋₂₀₇ mittels PCR amplifiziert. Mithilfe dieser Primer konnte ein zusätzliches für Methionin kodierendes Basentriplett vor den kodierenden Sequenzen der gewünschten Proteine angefügt werden, welches später zur Abspaltung vom Fusionstag genutzt werden konnte. Die Fragmente wurden danach durch Ligation in den pJet1.2/blunt-Vektor kloniert, um zur Vervielfältigung in die *E. coli* XL1-Blue-supercompetent-cells transformiert zu werden. Im Anschluss folgte eine Plasmidpräparation und eine Restriktionshydrolyse mit den Enzymen *Xba*I und *Bsa*I, um die passenden Überhänge für die Klonierung in den Expressionsvektor pE-SUMO3 zu generieren. Dieser sorgt für eine verbesserte Expressionsrate, schützt die rekombinanten Peptide vor Proteasen

und erleichtert die Aufreinigung (Butt *et al.*, 2005). Nachfolgend wurden die in Vektoren eingeschlossen Profilaggrin-Fragmente in die Expressionszellen *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformiert und der Sequenzierung zugeführt.

Es folgten die Induktion mit IPTG, sowie verschiedene Aufreinigungsschritte, in denen die entstandenen Fusionsproteine wieder von den zellulären Bestandteilen der Bakterien getrennt wurden.

Besondere Bedeutung kam nun der Spaltung des Fusionsproteins vom Fusionstag bei.

Im Falle der vorliegenden Arbeit konnte diese auf zwei Wegen erfolgen. Zum einen kann der Vektortag mit Hilfe der SUMO-Protease 2 vom Profilaggrin-Protein abgetrennt werden. Hierbei erkennt die Protease den pE-SUMO3-Tag anhand seiner Tertiärstruktur und spaltet diesen ab. Dieses Verfahren wurde in den vorangegangenen Dissertationen von Ch. Schulz, D. Karsch und S. Babian zum Thema antimikrobieller Eigenschaften des Profilaggrins genutzt. Diese Spaltung blieb jedoch in zahlreichen Versuchen unvollständig und führte zu erheblichen Proteinverlusten (Babian, 2010, Schulz, 2010, Karsch, 2011). Hier wurde trotz verschiedenster Variationen, wie der Veränderung der Reaktionstemperatur oder der Inkubationsdauer, keine vollständige Spaltung erzielt. In der hier vorliegenden Studie wurde ein anderes Verfahren zur Abtrennung des Fusionstags verwendet. Hierbei handelt es sich um die Spaltung mittels Bromcyan. Dieses ist ein Derivat der Blausäure und ist als chemisches Reagenz in der Lage, unabhängig vom Fusionstag, C-terminal von der Aminosäure Methionin zu schneiden. Um den Fusionstag vom gewünschten Profilaggrin-Protein abzuspalten wurde im Vorhinein mit Hilfe speziell erstellter Primer ein zusätzliches Methionin vor dem N-Terminus der generierten Fragmente eingefügt. Diese Methode ist hochspezifisch und erreicht eine Effizienz an Proteinspaltungen von bis zu 90-100% (Andreev *et al.*, 2010). Auch der pESUMO3-Tag besitzt drei Methionine. Nach der erfolgreichen Trennung zeigten sich demnach das abgespaltene Protein, sowie vier pE-SUMO3-Tag-Fragmente. Die Spaltung mittels Bromcyan konnte in der hier dargelegten Studie erfolgreich durchgeführt werden.

Es ist jedoch anzumerken, dass die Verwendung von Bromcyan unter besonderen Sicherheitsmaßnahmen erfolgen muss. Bromcyan hat besonders auf Haut und Schleimhäute eine reizende und ätzende Wirkung und kann zu Lungenschädigung, sowie Irritationen des Atem- und Magen-Darm-Traktes führen. Es gilt als sehr giftig, ätzend und umweltschädigend (GESTIS-Stoffdatenbank). Aus diesem Grund muss unter guten Be- und Entlüftungsbedingungen und in geschlossenen Apparaturen gearbeitet werden.

Des weiteren ist sie für Proteine, die selber Methionine enthalten ungeeignet, da dies zu Spaltungen innerhalb des Proteins führen würde.

Nach der Trennung vom Fusionstag erfolgten weitere Aufreinigungsschritte (siehe 2.13.4), sodass letztendlich die gewünschten Profilaggrin-Proteinfragmente vorlagen. Diese wurden durch den radialen Plattendiffusionstest (siehe 2.15) auf das Vorhandensein antimikrobieller Eigenschaften geprüft. Als Testorganismen wurden der Gram-positive Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, die Gram-negativen Stämme *Escherichia coli* ATCC 11303 und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, sowie die Hefe *Candida albicans* ATCC 24433 gewählt. Hierbei konnte für keines der drei getesteten Fragmente, der B-Domäne des Profilaggrin-N-Terminus, antimikrobielle Aktivität gegen einen der Testorganismen dokumentiert werden.

In den vorangegangenen Dissertationen unserer Arbeitsgruppe zu N-terminal gelegenen Profilaggrin-Fragmenten konnte jedoch *in vitro* antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden. Besonders interessant ist hierbei der Aspekt, dass die Fragmente der hier vorliegenden Arbeit, Teilstücke des in der Studie von Ch. Schulz antimikrobiell gegen *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und *Candida albicans* wirksamen PFLG-2 ist. Dieses umfasste die Aminosäuren 123-200, und somit auch den größten Teil der hier genutzten Profilaggrin-Fragmente. Das kleinste hier getestete Fragment FLG₁₆₂₋₁₈₄ ist sogar vollständig im PFLG-2 enthalten und konnte dennoch keine antimikrobielle Aktivität aufweisen. Auch das von D. Karsch untersuchte PFLG-4, welches die Aminosäuren 87-197 einnimmt und zusätzlich zu den drei Organismen, gegen die das PFLG-2 wirksam ist, Aktivität gegen *Pseudomonas aeruginosa* zeigt, schließt den größten Teil des FLG₁₆₂₋₂₀₇ und FLG₁₇₆₋₂₀₇ ein, sowie das komplette FLG₁₆₂₋₁₈₄ (für eine Übersicht der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Fragmente siehe Abb. 4.1).

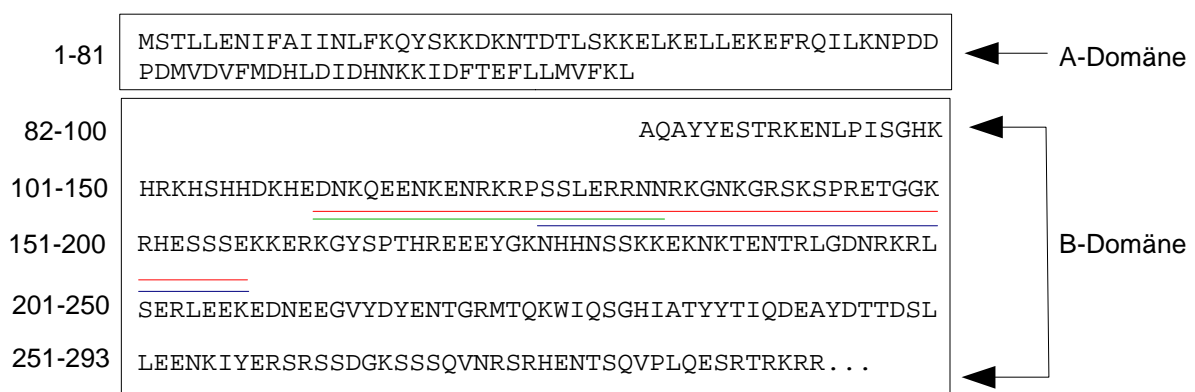


Abb. 4.1: Aminosäuresequenz des N-Terminus von Profilaggrin

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz des N-Terminus von Profilaggrin. Die 81 Aminosäuren große A-Domäne, sowie die 212 Aminosäuren umfassende B-Domäne sind markiert. Hervorgehoben sind außerdem die Sequenzen der Profilaggrin-Fragmente FLG₁₆₂₋₂₀₇ (rot), FLG₁₆₂₋₁₈₄ (grün) und FLG₁₇₆₋₂₀₇ (blau).

Die im Rahmen der Dissertationen von Ch. Schulz und D. Karsch überprüften PFLG-1 (Aminosäuren 87-122) und PFLG-3 (Aminosäuren 91-122) waren wiederum nicht antimikrobiell wirksam. Auch die in der Dissertation von B. Laudenbach getesteten Profilaggrin-Fragmente FLG₁₄₆₋₁₉₉ und FLG₁₄₆₋₂₀₀ zeigten keine antimikrobielle Aktivität gegen die vier Testorganismen (Garske, 2014). Die dazwischen liegenden und bisher noch nicht im einzelnen getesteten Aminosäuren 123 bis 145 sind in den antimikrobiell wirksamen Fragmenten PFLG-2 und -4 enthalten und könnten demnach der Schlüssel zu deren antimikrobieller Aktivität sein. Dieses Profilaggrin-Fragment wird Gegenstand zukünftiger Testungen sein.

Die meisten antimikrobiellen Peptide zeigen einen ausgeprägten Überschuss an positiv geladenen Aminosäuren wie Arginin und Lysin (Hancock und Chapple, 1999). Der isoelektrische Punkt (pI-Wert) beschreibt den pH-Wert bei dem gleich viele positive wie negative Ladungen vorliegen. Dieser Wert ist bei den hier verwendeten Peptiden mit 9,63 (FLG₁₆₂₋₂₀₇), 9,99 (FLG₁₇₆₋₂₀₇) und 9,31 (FLG₁₆₂₋₁₈₄) sehr kationisch. Diese pI-Werte liegen zwar unter dem des antimikrobiell aktiven PFLG-2 und -4 (10,71 und 10,19), allerdings auch über dem der nicht aktiven PFLG-1 und -3 (8,46 und 8,39). Doch trotz der hohen Kationizität der Peptide zeigten sie keine Aktivität gegen die Testorganismen.

Des Weiteren ist zu bedenken, dass hier nur ein einziges Testsystem verwendet wurde. Es konnte z. B. In einer Studie von Kacprzyk *et al.* gezeigt werden, dass ein saurer pH-Wert der Umgebung die antimikrobielle Aktivität von Histidin-reichen Peptiden beeinflussen kann. Histidine, welche auch in den hier untersuchten Profilaggrin-Fragmenten enthalten sind, sind basische Aminosäuren und werden im sauren Milieu protoniert und kationisch. In der Studie wurde gezeigt, dass die antimikrobielle Aktivität der untersuchten Histidin-reichen Peptide unter neutralen pH-Bedingungen komplett verschwand. Erst nach Herstellung eines sauren Umgebungsmilieus konnte erneut eine antimikrobielle Aktivität hergestellt werden (Kacprzyk *et al.*, 2007). Dies zeigt, dass die Veränderung des pH-Wertes durchaus eine Rolle in der Aktivität von antimikrobiell wirksamen Substanzen spielt. Dieser wurde hier im radialen Plattendiffusionstest jedoch nicht verändert und blieb konstant bei 7,0-7,2. Es könnte sein, dass diese oder auch andere Versuchsbedingungen, wie z.B. die Zusammensetzung des Test-Agars, die Aktivität der Peptide beeinträchtigt haben und in anderen analytischen Verfahren ein anderes Ergebnis erzielt werden könnte.

Ein weiterer Grund für die fehlende antimikrobielle Aktivität könnte die Größe der Peptide sein. In einer Studie von Bessalle *et al.* wurden mehrere Peptide hergestellt und auf ihre Aktivität hin untersucht. Hierbei fiel auf, dass längere Peptide generell eine höhere antimikrobielle Aktivität aufwiesen als kürzere (Bessalle *et al.*, 1993). Die hier untersuchten

Profilaggrin-Fragmente waren mit ihrer Größe von 45 (FLG₁₆₂₋₂₀₇), 31 (FLG₁₇₆₋₂₀₇) und 22 (FLG₁₆₂₋₁₈₄) Aminosäuren verhältnismäßig klein im Vergleich zu den antimikrobiell aktiven PFLG-2 (77 Aminosäuren), bzw. PFLG-4 (110 Aminosäuren). Es könnte sein, dass die Peptide auf Grund ihrer geringen Größe, nicht in der Lage waren bestimmte Sekundärstrukturen zu formen, die für eine antimikrobielle Aktivität nötig gewesen wären. Da die jeweils um mehr als das doppelte an Länge umfassenden Fragmente Aktivität aufwiesen und die jeweils kleineren Fragmente nicht, könnte dies ein Grund für deren fehlende Aktivität sein.

Bei der genaueren Betrachtung der einzelnen getesteten Fragmente fällt außerdem auf, dass das aus PFLG-1 und -2 zusammengesetzte PFLG-4 (abzüglich dreier Aminosäuren) gegen alle vier Keime Wirksamkeit zeigte, wohingegen das PFLG-2 nur gegen drei Mikroorganismen wirksam war und PFLG-1 gegen keinen der getesteten. Dies legte die Vermutung nahe, dass diese Aktivität auch auf das Zusammenwirken bestimmter chemischer und physikalischer Eigenschaften der beiden Teilsequenzen zurückzuführen sei (Schulz, 2010). Aus diesem Grund, wurde in der vorliegenden Studie abschließend untersucht, ob durch Vermischen der drei Teilfragmente eine gewisse Interaktion untereinander statt findet und dadurch eine antimikrobielle Aktivität erzielbar ist. Doch auch in dieser Kombination konnte keine Wirksamkeit gegen einen der vier Keime nachgewiesen werden.

Das es jedoch gewisse Interaktionen zwischen antimikrobiellen Peptiden gibt, welche synergistische Effekte haben, zeigten beispielsweise Singh *et al.* in einer Studie, in der verschiedene antimikrobielle Peptide des humanen Respirationstraktes miteinander kombiniert wurden. Hierbei untersuchte man die Wirksamkeit gegen einen Stamm der *Escherichia coli*-Bakterien und fand unter anderem für Lysozym und Lactoferrin *in vitro* synergistische Effekte (Singh *et al.*, 2000). Dies zeigt, dass Interaktionen zwischen antimikrobiellen Peptiden des Menschen möglich sind und sie sogar die Wirksamkeit untereinander beeinflussen können. Welche genauen Eigenschaften der Proteine für diese synergistischen Effekte verantwortlich sind, ist bisher noch unklar, jedoch könnten diese auch für die hier vorgestellten Fragmente des Profilaggrins gelten. Es könnten beispielsweise bestimmte Kombinationen von Aminosäuren dafür sorgen, dass durch Wechselwirkungen untereinander eine Tertiärstruktur entsteht, die einen Signalweg auslöst, der uns bislang noch unbekannt ist.

Des weiteren spielen auch immer die Versuchsbedingungen eine Rolle. In der bereits erwähnten Studie von Singh *et al.* konnte außerdem gezeigt werden, dass die Interaktionen zwischen den antimikrobiellen Peptiden, welche den Synergismus hervorriefen, durch eine Erhöhung der Natriumchlorid-Konzentration inhibierbar sind, sodass dieser Effekt vollständig

unterdrückt werden konnte (Singh *et al.*, 2000).

Letztendlich stellen diese Untersuchungen insgesamt Ergebnisse *in vitro* dar. Die antimikrobielle Aktivität von Profilaggrin bzw. dessen N-terminalen Fragmenten *in vivo* kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht ausreichend belegt werden. Profilaggrin ist grundsätzlich nicht als antimikrobielles Peptid zu bezeichnen. Es wird angenommen, dass seine Hauptaufgabe die Mitwirkung an der Entstehung des *Stratum corneum* und die hiermit verbundene Aggregation der Zytokeratinfilamente ist. Dass es jedoch noch weitere Aufgaben, wie die Beteiligung an der Hydratisierung der Haut inne hat, ist bereits bekannt. Aus diesem Grund ist es durchaus denkbar, dass es zusätzlich auch in der antimikrobiellen Abwehr der Haut eine Rolle spielt. Es lässt sich in keine der bekannten Gruppen von antimikrobiellen Peptiden einteilen und im Gegensatz zu den meisten dieser Moleküle ist es um ein Vielfaches größer. Es ist jedoch möglich, dass lediglich Peptide des N-Terminus während der terminalen Prozessierung abgespalten werden, die dann antimikrobielle Eigenschaften besitzen. Allerdings erfordert es weitere Studien um diese Aktivität zunächst *in vivo* nachzuweisen und wirksame Peptide dann auch therapeutisch nutzen zu können.

Generell muss sich der pharmakologische Nutzen von antimikrobiellen Peptiden in den kommenden Jahren erst noch zeigen, trotzdem liegen bereits große Hoffnungen auf ihnen. Diese Peptide beschützen seit Millionen von Jahren Wirbellose, Pflanzen, Tiere und damit eingeschlossen auch den menschlichen Körper vor pathogenen Mikroorganismen. Dies macht sie zu einem begehrten Therapeutikum in einer Zeit, in der die Entwicklung von Resistenzen gegen herkömmliche Antibiotika immer stärker zum Tragen kommt. Bei topischer Applikation konnten andere antimikrobielle Peptide bereits Aktivität *in vivo* zeigen (Kruszewska *et al.*, 2004, Rubinchik *et al.*, 2009), jedoch ist die systemische Verwendung als Therapeutika immer noch schwierig. Problematisch ist zum einen der zu schnelle Abbau der Peptide durch körpereigene Proteasen und zum anderen die reduzierte Halbwertszeit kleiner Peptide durch die Filtrationswirkung der Nieren (McGregor, 2008). Es müssen verschiedene Strategien entwickelt werden, wie man diese Hindernisse umgehen kann.

Verschiedene antimikrobielle Peptide wirken nicht nur gegen Gram-negative und -positive Bakterien, sondern auch gegen Pilze, Parasiten, umhüllte Viren oder auch Tumorzellen (Hancock und Diamond, 2000). Diese Vielschichtigkeit macht sie zu einem der wichtigsten Systeme in der Immunabwehr von Lebewesen.

Ihre Bedeutsamkeit lässt sich anhand von Krankheiten erkennen, bei denen bestimmte antimikrobielle Peptide gar nicht oder nur in geringem Maße produziert werden. Ein Beispiel hierfür sind chronisch entzündliche Darmerkrankungen, wie die Colitis ulcerosa oder auch der Morbus Crohn. Diese sind auf eine Reihe von Störungen in der epithelialen

Abwehr zurückzuführen, unter anderem auch auf eine beeinträchtigte Synthese antimikrobieller Peptide (Antoni *et al.*, 2014).

Das in dieser Arbeit untersuchte Profilaggrin gehört zwar zu keiner bisher bekannten Klasse von antimikrobiellen Peptiden, dennoch führen Mutationen im Profilaggrin-Gen zu Erkrankungen, die auf eine gestörte Barrierefunktion der Haut gegen pathogene Keime und ggf. auch auf eine gestörte antimikrobielle Abwehr zurückzuführen sind.

Diese Mutationen sind ursächlich für die Hautkrankheit Ichthyosis vulgaris und stellen erhebliche Risikofaktoren für die atopische Dermatitis (AD) dar (Palmer *et al.*, 2006, Smith *et al.*, 2006). Die häufigsten Nullmutationen des Profilaggrin-Gens in Europa sind die R510X und 2282del4 (Palmer *et al.*, 2006). Allein anhand dieser beiden Krankheitsbilder erkennt man den hohen Stellenwert, den das Profilaggrin beim Aufbau einer gesunden und funktionstüchtigen Hautbarriere inne hat.

Inwieweit die antimikrobielle Wirksamkeit, welche *in vitro* für Fragmente des N-Terminus des Profilaggrins nachgewiesen werden konnte, auch *in vivo* eine Rolle für die Gesundheit der Haut spielt, ist bislang nicht geklärt. Besonders eindrucksvoll ist jedoch die Tatsache, dass in der Haut von über 90% der Patienten mit AD, welche nur geringe Mengen an Filaggrin besitzen, gesteigerte Besiedelungen mit *Staphylococcus aureus* vorzufinden sind (O'Regan *et al.*, 2009). Es wäre möglich, dass dies unter anderem auch auf ein Fehlen der antimikrobiellen Wirkung des Profilaggrin zurückzuführen ist. Es ist bekannt, dass Patienten mit AD einen erhöhten pH der Haut aufweisen. Da dieser wie bereits erwähnt, die Aktivität Histidin-reicher antimikrobieller Peptide inhibieren kann, könnte dies ein möglicher Grund für die erhöhte Besiedelung mit *Staphylococcen* bei Atopikern sein.

Wenn antimikrobielle Peptide im Allgemeinen in ihrer Wirkungsweise besser verstanden werden könnten und man wüsste, welche genauen Sequenzen für die antimikrobielle Eigenschaft verantwortlich sind, könnten sie als Alternative zu den herkömmlichen Antibiotika eingesetzt werden. Ihr breites Wirkspektrum gegen Bakterien, Pilze, Parasiten, umhüllte Viren und Tumorzellen könnte völlig neue Therapiemöglichkeiten eröffnen. Zudem müssen jedoch auch Möglichkeiten gefunden werden, die Halbwertszeiten dieser Substanzen zu verlängern, um dem zu schnellen Abbau entgegen zu wirken. Es wäre denkbar, dann die antimikrobiellen Peptide synthetisch herzustellen oder auch nur Derivate, welche die benötigte Information für ihre antimikrobielle, antivirale oder antifungizide Wirkung beinhaltet. Beispielsweise gelang es in einer Studie von Rodriguez *et al.*, das antimikrobielle Peptid Pandinin 2 (Pin2) synthetisch herzustellen und es so zu modifizieren, dass seine hämolytischen Eigenschaften auf Erythrozyten reduziert werden konnten, seine antimikrobielle Aktivität jedoch erhalten blieb. Dieses Peptid zeigte *in vitro* Wirksamkeit

gegen Gram-negative und -positive Bakterien. Zudem konnte eine antimikrobielle Wirksamkeit gegen multiresistente Stämme des *Mycobacterium tuberculosis* nachgewiesen werden (Rodriguez *et al.*, 2014).

Des weiteren könnte man versuchen, über eine Induktion die Herstellung der körpereigenen antimikrobiellen Peptide zu erhöhen. Es sind bereits mehrere Mediatoren bekannt, welche antimikrobielle Peptide während der Wundheilung oder bei Entzündungsreaktionen induzieren. Beispielsweise zeigten Miller *et al.* 2005 in einer Studie, dass in Anwesenheit von TGF- α , einem Wachstumsfaktor, der bei der Wundheilung und bei der Verhornungsstörung Psoriasis verstärkt involviert ist, die Expression der Toll-like-Rezeptoren TLR-5 und TLR-9 auf Keratinozyten, sowie deren Liganden-gesteuerte Aktivierung verstärkt wird. Dies resultiert in einer erhöhten Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-8 und den antimikrobiellen Peptiden hBD2 und hBD3 (Miller *et al.*, 2005). Wenn man diese TLR-vermittelten Immunantworten beeinflussen könnte, ohne eine Entzündungsreaktion auszulösen, könnte man die körpereigenen antimikrobiellen Peptide und somit auch das körpereigene Immunsystem verstärken.

Auch die synergistischen Effekte zwischen den antimikrobiellen Peptiden könnten sich therapeutisch nutzen lassen. Wenn man die genauen Mechanismen ergründen könnte, wäre das eine Möglichkeit, die Synthese bestimmter Proteine, sowie deren Aktivität zu steigern.

Ein weiterer Ansatzpunkt für mögliche Therapieoptionen mit antimikrobiellen Peptiden ist die kommensale Mikroflora der Haut. Die apathogenen Mikroben, welche natürlicherweise auf der Haut vorkommen, können ebenso antimikrobielle Peptide, sogenannte Bakteriocine, herstellen. Diese sind den eukaryotischen antimikrobiellen Peptiden sehr ähnlich. Sie sind ebenso mit ihren 20-50 Aminosäuren relativ klein, meist kationisch und hydrophob und können mit negativ geladenen Bakterienmembranen interagieren. Dort bilden sie Poren um fremde Bakterien abzutöten (Hassan *et al.*, 2012). Es konnte bereits in einer Studie von Heunis *et al.* gezeigt werden, dass Bakteriocine therapeutisch bei Hautinfektionen genutzt werden können. Hierfür wurden im Mausmodell Wunden mit Nisin-haltigen Nanofasern abgedeckt. Nisin gehört als Lantibiotikum zu den Bakteriocinen und ist besonders gegen *Staphylococcus aureus* wirksam. In der Studie wurde nachgewiesen, dass das freigesetzte Nisin in der Lage war, das Wachstum von *Staphylococcus aureus* in der Wunde zu hemmen und die Rate an Wundinfektionen mit diesem Bakterium zu reduzieren (Heunis *et al.*, 2013).

All diese Beispiele für die therapeutische Nutzung von antimikrobiellen Peptiden sind von großem medizinischen Interesse, da Alternativen gefunden werden müssen, welche die heutzutage allgegenwärtigen multiresistenten Keime wirkungsvoll bekämpfen können. Es gibt bereits zahlreiche Studien, die die Wirkungsweise antimikrobieller Peptide untersuchen

und deren therapeutische Anwendung testen. Noch ist keines dieser Moleküle für die kommerzielle Anwendung zugelassen, jedoch befinden sich bereits mehrere in Phase-III-Studien (Hancock und Sahl, 2006, Zaiou, 2007) und zeigen vielversprechende Ergebnisse. Es bleibt abzuwarten, ob sich die Anwendung antimikrobieller Peptide im therapeutischen Bereich durchsetzen kann.

5 Zusammenfassung

In den vergangenen 100 Jahren konnten durch die therapeutische Verwendung von Antibiotika zahlreiche Erkrankungen bekämpft und schwerwiegende Folgen von Infektionen verhindert werden. In der heutigen Zeit kommt es jedoch immer häufiger zu schweren Infektionen mit Erregern, welche sich gegen viele der herkömmlichen Antibiotika-Klassen resistent zeigen. Um diese erfolgreich bekämpfen zu können, suchen Forscher nach Alternativen, welche nicht nur wirksam gegen diese für den Menschen gefährlichen Mikroorganismen sind, sondern auch das Potential haben, über längere Zeit der schnellen Resistenzenentwicklung von Bakterien zu entgehen. Eine mögliche Alternative könnten die antimikrobiellen Peptide darstellen. Diese schützen seit Millionen von Jahren Pflanzen und Tiere als körpereigene Antibiotika. Es wurden bereits zahlreiche dieser Peptide entdeckt und mittlerweile auch für die pharmakologische Anwendung getestet.

In der Gruppe der „S100 Fused-Type“-Proteine konnten bereits Hornerin und Filaggrin-2 als antimikrobiell wirksam identifiziert werden. Nachfolgend wurde auch das ebenso zu dieser Proteinfamilie gehörende Profilaggrin auf antimikrobielle Aktivität hin untersucht.

In Analysen von Trypsin-verdauten Proteinextrakten des *Stratum corneum* gesunder Menschen wurden antimikrobiell aktive Fraktionen aus der B-Domäne des N-Terminus des Profilaggrins gefunden. In unserer Arbeitsgruppe konnten daraufhin im Rahmen zweier Dissertationen zwei Sequenzen des N-Terminus ermittelt werden, welche antimikrobielle Aktivität aufwiesen.

Um die Region, welche für die antimikrobielle Aktivität verantwortlich ist, noch weiter einzugrenzen, wurden drei weitere Peptidstücke des N-Terminus des Profilaggrins ausgewählt und in der vorliegenden Studie untersucht. Hierfür wurden zwei Peptidfragmente rekombinant hergestellt und aufgereinigt, ein weiteres lag synthetisch hergestellt vor. Insgesamt umfassten diese die Aminosäuren 162-207, 176-207 und 162-184.

Die antimikrobielle Testung erfolgte mittels radialem Plattendiffusionstest gegen das Gram-positive Bakterium *Staphylococcus aureus*, die Gram-negativen Bakterien *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*, sowie die Hefe *Candida albicans*.

In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte jedoch für keines der drei Fragmente eine Aktivität gegen die getesteten Mikroorganismen nachgewiesen werden.

Nichtsdestotrotz bleibt das Profilaggrin Gegenstand weiterer Studien. Die Wirkmechanismen von antimikrobiellen Peptiden und die damit verbundenen therapeutischen Möglichkeiten sind weiterhin von großem wissenschaftlichen Interesse.

6 Anhang

6.1 Vektorkarten

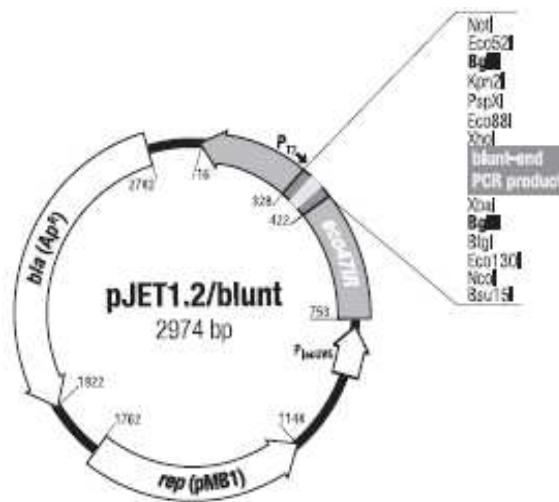


Abb. 6.1: Schematische Darstellung des pJet1.2/blunt-Vektors.

Eingezeichnet sind die Schnittstellen der Restriktionsenzyme, sowie als Kästen wichtige Sequenzabschnitte. *Bla* (Ap): β -Lactamase-Gen für die Ampicillin-Resistenz, *rep* (pMB1): Replicon vom pMBI-Plasmid, *eco47IR*: Letalgen zur positiven Selektion. (Aus: ThermoScientific CloneJET PCR Cloning Kit, Product Information, Vector Map)

6.2 Peptidfragmente

6.2.1 FLG₁₆₂₋₂₀₇

Nukleotidsequenz (bp 484-621):

aaaggatattcacctactcatagagaagaagaatatggaaaaaacatcataactcaagtaaaaaaga
gaaaaacaagactgaaaatactagattaggagacaataggaagaggctaagtgaaagacttgaagaga
aa

Proteinsequenz (Aminosäuren 162-207):

KGYSPTHREEEYGKNHHNSSKKEKNKTENTRLGDNRKRLSERLEEK

Molekulargewicht [Da]: 5540.0

theoretischer pI-Wert: 9.63

Extinktionskoeffizient [l/mol x cm]: 2980

6.2.2 FLG₁₇₆₋₂₀₇

Nukleotidsequenz (bp 526-621):

aaccatcataactcaagtaaaaaagagaaaaacaagactgaaaatactagattaggagacaataggaa
gaggctaagtgaaagacttgaagagaaa

Proteinsequenz (Aminosäuren 176-207):

NHHNSSKKEKNKTENTRLGDNRKRLSERLEEK

Molekulargewicht [Da]: 3877.2

theoretischer pI-Wert: 9.99

Extinktionskoeffizient [l/mol x cm]: -

6.2.3 FLG₁₆₂₋₁₈₄

Nukleotidsequenz (bp 484-549):

aaaggatattcacctactcatagagaagaagaatatggaaaaaaccatcataactcaagtaaaaaa

Proteinsequenz (Aminosäuren 162-184):

KGYSPTTHREEEYGKNHHNSSKK

Molekulargewicht [Da]: 2613.7

theoretischer pI-Wert: 9.31

Extinktionskoeffizient [l/mol x cm]: 2980

6.3 bisher getestete Profilaggrin-Teilfragmente

Profilaggrin-Fragmente [Aminosäuren]	
antimikrobiell wirksam	nicht antimikrobiell wirksam
87-197 (D. Karsch)	87-122 (Ch. Schulz)
123-200 (Ch. Schulz)	91-122 (D. Karsch)
764-903 (A. Schmidt)	146-199 (B. Laudénbach)
2849-2900 (A. Schmidt)	146-200 (B. Laudénbach)
	162-207 (K. Garske)
	162-184 (K. Garske)
	176-207 (K. Garske)
	3605-3879 (S. Babian)

7 Literaturverzeichnis

- Andreev, Y. A., Kozlov, S. A., Vassilevski, A. A. und Grishin, E. V. (2010). Cyanogen Bromide Cleavage of Proteins in Salt and Buffer Solutions. *Anal Biochem* 407(1): 144-146.
- Antoni, L., Nuding, S., Wehkamp, J. und Stange, E. F. (2014). Intestinal Barrier in Inflammatory Bowel Disease. *World J Gastroenterol* 20(5): 1165-1179.
- Babian, S. (2010). Untersuchungen Zur Rolle Des Profilaggrin-Proteins Flg₃₆₀₅₋₃₈₇₉ in Der Antimikrobiellen Hautabwehr. (Dissertation).
- Bensch, K. W., Raida, M., Magert, H. J., Schulz-Knappe, P. und Forssmann, W. G. (1995). Hbd-1: A Novel Beta-Defensin from Human Plasma. *FEBS Lett* 368(2): 331-335.
- Bessalle, R., Gorea, A., Shalit, I., Metzger, J. W., Dass, C., Desiderio, D. M. und Fridkin, M. (1993). Structure-Function Studies of Amphiphilic Antibacterial Peptides. *J Med Chem* 36(9): 1203-1209.
- Boman, H. G. (2003). Antibacterial Peptides: Basic Facts and Emerging Concepts. *J Intern Med* 254(3): 197-215.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3(3): 238-250.
- Butt, T. R., Edavettal, S. C., Hall, J. P. und Mattern, M. R. (2005). Sumo Fusion Technology for Difficult-to-Express Proteins. *Protein Expr Purif* 43(1): 1-9.
- Candi, E., Schmidt, R. und Melino, G. (2005). The Cornified Envelope: A Model of Cell Death in the Skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(4): 328-340.
- Chapman, S. J. und Walsh, A. (1990). Desmosomes, Corneosomes and Desquamation. An Ultrastructural Study of Adult Pig Epidermis. *Arch Dermatol Res* 282(5): 304-310.
- Contzler, R., Favre, B., Huber, M. und Hohl, D. (2005). Cornulin, a New Member of the "Fused Gene" Family, Is Expressed During Epidermal Differentiation. *J Invest Dermatol* 124(5): 990-997.
- Costelloe, C., Metcalfe, C., Lovering, A., Mant, D. und Hay, A. D. (2010). Effect of Antibiotic Prescribing in Primary Care on Antimicrobial Resistance in Individual Patients: Systematic Review and Meta-Analysis. *BMJ* 340: c2096.
- Drake, D. R., Brogden, K. A., Dawson, D. V. und Wertz, P. W. (2008). Thematic Review Series: Skin Lipids. Antimicrobial Lipids at the Skin Surface. *J Lipid Res* 49(1): 4-11.

- European Centre for Disease Prevention and Control. (2014). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC.
- Frohm, M., Agerberth, B., Ahangari, G., Stahle-Backdahl, M., Liden, S., Wigzell, H. und Gudmundsson, G. H. (1997). The Expression of the Gene Coding for the Antibacterial Peptide LL-37 Is Induced in Human Keratinocytes During Inflammatory Disorders. *J Biol Chem* 272(24): 15258-15263.
- Gan, S. Q., McBride, O. W., Idler, W. W., Markova, N. und Steinert, P. M. (1990). Organization, Structure, and Polymorphisms of the Human Profilaggrin Gene. *Biochemistry* 29(40): 9432-9440.
- Ganz, T., Selsted, M. E., Szklarek, D., Harwig, S. S., Daher, K., Bainton, D. F. und Lehrer, R. I. (1985). Defensins. Natural Peptide Antibiotics of Human Neutrophils. *J Clin Invest* 76(4): 1427-1435.
- Garske, K., Laudénbach, B., Hansmann, B., Bartels, J., Schröder, J.-M. (2014). N-terminal profilaggrin peptide fragments as contributors to the antimicrobial barrier of the skin [Abstract]. 41th Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Marburg. P046.
- Gläser, R., Harder, J., Lange, H., Bartels, J., Christophers, E. und Schröder, J. M. (2005). Antimicrobial Psoriasin (S100a7) Protects Human Skin from Escherichia Coli Infection. *Nat Immunol* 6(1): 57-64.
- Hancock, R. E. und Chapple, D. S. (1999). Peptide Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 43(6): 1317-1323.
- Hancock, R. E. und Diamond, G. (2000). The Role of Cationic Antimicrobial Peptides in Innate Host Defences. *Trends Microbiol* 8(9): 402-410.
- Hancock, R. E. und Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and Host-Defense Peptides as New Anti-Infective Therapeutic Strategies. *Nat Biotechnol* 24(12): 1551-1557.
- Harbarth, S. und Samore, M. H. (2005). Antimicrobial Resistance Determinants and Future Control. *Emerg Infect Dis* 11(6): 794-801.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. und Schröder, J. M. (1997). A Peptide Antibiotic from Human Skin. *Nature* 387(6636): 861.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. und Schröder, J. M. (2001). Isolation and Characterization of Human Beta -Defensin-3, a Novel Human Inducible Peptide Antibiotic. *J Biol Chem* 276(8): 5707-5713.

- Harder, J., Gläser, R. und Schröder, J. M. (2007). Human Antimicrobial Proteins Effectors of Innate Immunity. *J Endotoxin Res* 13(6): 317-338.
- Harder, J. und Schröder, J. M. (2002). Rnase 7, a Novel Innate Immune Defense Antimicrobial Protein of Healthy Human Skin. *J Biol Chem* 277(48): 46779-46784.
- Harder, J. und Schröder, J. M. (2005). Psoriatic Scales: A Promising Source for the Isolation of Human Skin-Derived Antimicrobial Proteins. *J Leukoc Biol* 77(4): 476-486.
- Hassan, M., Kjos, M., Nes, I. F., Diep, D. B. und Lotfipour, F. (2012). Natural Antimicrobial Peptides from Bacteria: Characteristics and Potential Applications to Fight against Antibiotic Resistance. *J Appl Microbiol* 113(4): 723-736.
- Henry, J., Toulza, E., Hsu, C. Y., Pellerin, L., Balica, S., Mazereeuw-Hautier, J., Paul, C., Serre, G., Jonca, N. und Simon, M. (2012). Update on the Epidermal Differentiation Complex. *Front Biosci (Landmark Ed)* 17: 1517-1532.
- Heunis, T. D., Smith, C. und Dicks, L. M. (2013). Evaluation of a Nisin-Eluting Nanofiber Scaffold to Treat Staphylococcus Aureus-Induced Skin Infections in Mice. *Antimicrob Agents Chemother* 57(8): 3928-3935.
- Huber, M., Siegenthaler, G., Mirancea, N., Marenholz, I., Nizetic, D., Breitkreutz, D., Mischke, D. und Hohl, D. (2005). Isolation and Characterization of Human Repetin, a Member of the Fused Gene Family of the Epidermal Differentiation Complex. *J Invest Dermatol* 124(5): 998-1007.
- Irvine, A. D. und McLean, W. H. (2006). Breaking the (Un)Sound Barrier: Filaggrin Is a Major Gene for Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol* 126(6): 1200-1202.
- Janeway, C., Travers P, Walport M, et al. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science; Principles of innate and adaptive immunity. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27090/> (2001).
- Kacprzyk, L., Rydengard, V., Morgelin, M., Davoudi, M., Pasupuleti, M., Malmsten, M. und Schmidtchen, A. (2007). Antimicrobial Activity of Histidine-Rich Peptides Is Dependent on Acidic Conditions. *Biochim Biophys Acta* 1768(11): 2667-2680.
- Kagan, B. L., Selsted, M. E., Ganz, T. und Lehrer, R. I. (1990). Antimicrobial Defensin Peptides Form Voltage-Dependent Ion-Permeable Channels in Planar Lipid Bilayer Membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(1): 210-214.
- Kalinin, A., Marekov, L. N. und Steinert, P. M. (2001). Assembly of the Epidermal Cornified Cell Envelope. *J Cell Sci* 114(Pt 17): 3069-3070.
- Karsch, D. (2011). Untersuchung Zur Rolle Der Profilaggrin-Peptide Flg₉₁₋₁₂₂ Und Flg₈₇₋₁₉₇ in Der Kutanen Abwehr [Dissertation]. Kiel: Christian-Albrechts-Universität.

- Kezic, S., Kemperman, P. M., Koster, E. S., de Jongh, C. M., Thio, H. B., Campbell, L. E., Irvine, A. D., McLean, W. H., Puppels, G. J. und Caspers, P. J. (2008). Loss-of-Function Mutations in the Filaggrin Gene Lead to Reduced Level of Natural Moisturizing Factor in the Stratum Corneum. *J Invest Dermatol* 128(8): 2117-2119.
- Kezic, S., O'Regan, G. M., Lutter, R., Jakasa, I., Koster, E. S., Saunders, S., Caspers, P., Kemperman, P. M., Puppels, G. J., Sandilands, A., Chen, H., Campbell, L. E., Kroboth, K., Watson, R., Fallon, P. G., McLean, W. H. und Irvine, A. D. (2012). Filaggrin Loss-of-Function Mutations Are Associated with Enhanced Expression of IL-1 Cytokines in the Stratum Corneum of Patients with Atopic Dermatitis and in a Murine Model of Filaggrin Deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 129(4): 1031-1039 e1031.
- Kruszewska, D., Sahl, H. G., Bierbaum, G., Pag, U., Hynes, S. O. und Ljungh, A. (2004). Mersacidin Eradicates Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (Mrsa) in a Mouse Rhinitis Model. *J Antimicrob Chemother* 54(3): 648-653.
- Lee, S. C., Kim, I. G., Marekov, L. N., O'Keefe, E. J., Parry, D. A. und Steinert, P. M. (1993). The Structure of Human Trichohyalin. Potential Multiple Roles as a Functional Ef-Hand-Like Calcium-Binding Protein, a Cornified Cell Envelope Precursor, and an Intermediate Filament-Associated (Cross-Linking) Protein. *J Biol Chem* 268(16): 12164-12176.
- Lippens, S., Denecker, G., Ovaere, P., Vandenabeele, P. und Declercq, W. (2005). Death Penalty for Keratinocytes: Apoptosis Versus Cornification. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2: 1497-1508.
- List, K., Szabo, R., Wertz, P. W., Segre, J., Haudenschild, C. C., Kim, S. Y. und Bugge, T. H. (2003). Loss of Proteolytically Processed Filaggrin Caused by Epidermal Deletion of Matriptase/Mt-Sp1. *J Cell Biol* 163(4): 901-910.
- Lüllmann-Rauch, R. (2006). *Histologie*, 2. Auflage, Thieme, Stuttgart.
- Marshall, D., Hardman, M. J., Nield, K. M. und Byrne, C. (2001). Differentially Expressed Late Constituents of the Epidermal Cornified Envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(23): 13031-13036.
- McGregor, D. P. (2008). Discovering and Improving Novel Peptide Therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 8(5): 616-619.
- McKinley-Grant, L. J., Idler, W. W., Bernstein, I. A., Parry, D. A., Cannizzaro, L., Croce, C. M., Huebner, K., Lessin, S. R. und Steinert, P. M. (1989). Characterization of a Cdna Clone Encoding Human Filaggrin and Localization of the Gene to Chromosome Region 1q21. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(13): 4848-4852.
- Menon, G. K., Grayson, S. und Elias, P. M. (1985). Ionic Calcium Reservoirs in Mammalian Epidermis: Ultrastructural Localization by Ion-Capture Cytochemistry. *J Invest Dermatol* 84(6): 508-512.

- Miajlovic, H., Fallon, P. G., Irvine, A. D. und Foster, T. J. (2010). Effect of Filaggrin Breakdown Products on Growth of and Protein Expression by *Staphylococcus Aureus*. *J Allergy Clin Immunol* 126(6): 1184-1190 e1183.
- Miller, L. S., Sorensen, O. E., Liu, P. T., Jalian, H. R., Eshtiaghpour, D., Behmanesh, B. E., Chung, W., Starner, T. D., Kim, J., Sieling, P. A., Ganz, T. und Modlin, R. L. (2005). Tgf-Alpha Regulates Tlr Expression and Function on Epidermal Keratinocytes. *J Immunol* 174(10): 6137-6143.
- Mischke, D., Korge, B. P., Marenholz, I., Volz, A. und Ziegler, A. (1996). Genes Encoding Structural Proteins of Epidermal Cornification and S100 Calcium-Binding Proteins Form a Gene Complex ("Epidermal Differentiation Complex") on Human Chromosome 1q21. *J Invest Dermatol* 106(5): 989-992.
- O'Regan, G. M., Sandilands, A., McLean, W. H. und Irvine, A. D. (2009). Filaggrin in Atopic Dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 124(3 Suppl 2): R2-6.
- Ouellette, A. J., Miller, S. I., Henschen, A. H. und Selsted, M. E. (1992). Purification and Primary Structure of Murine Cryptdin-1, a Paneth Cell Defensin. *FEBS Lett* 304(2-3): 146-148.
- Palmer, C. N., Irvine, A. D., Terron-Kwiatkowski, A., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S. P., Goudie, D. R., Sandilands, A., Campbell, L. E., Smith, F. J., O'Regan, G. M., Watson, R. M., Cecil, J. E., Bale, S. J., Compton, J. G., DiGiovanna, J. J., Fleckman, P., Lewis-Jones, S., Arseculeratne, G., Sergeant, A., Munro, C. S., El Houate, B., McElreavey, K., Halkjaer, L. B., Bisgaard, H., Mukhopadhyay, S. und McLean, W. H. (2006). Common Loss-of-Function Variants of the Epidermal Barrier Protein Filaggrin Are a Major Predisposing Factor for Atopic Dermatitis. *Nat Genet* 38(4): 441-446.
- Pearton, D. J., Dale, B. A. und Presland, R. B. (2002). Functional Analysis of the Profilaggrin N-Terminal Peptide: Identification of Domains That Regulate Nuclear and Cytoplasmic Distribution. *J Invest Dermatol* 119(3): 661-669.
- Presland, R. B., Haydock, P. V., Fleckman, P., Nirunsuksiri, W. und Dale, B. A. (1992). Characterization of the Human Epidermal Profilaggrin Gene. Genomic Organization and Identification of an S-100-Like Calcium Binding Domain at the Amino Terminus. *J Biol Chem* 267(33): 23772-23781.
- Pschyrembel, W., Dornblüth, O., Pschyrembel Klinisches Wörterbuch: 260. Auflage (2004), Verlag Walter De Gruyter, Berlin, Seite 162 (Atopie), Seite 464 (atopisches Ekzem), Seite 836 (Ichthyosis vulgaris).
- Rodriguez, A., Villegas, E., Montoya-Rosales, A., Rivas-Santiago, B. und Corzo, G. (2014). Characterization of Antibacterial and Hemolytic Activity of Synthetic Pandinin 2 Variants and Their Inhibition against *Mycobacterium Tuberculosis*. *PLoS One* 9(7): e101742.

- Rubinchik, E., Dugourd, D., Algara, T., Pasetka, C. und Friedland, H. D. (2009). Antimicrobial and Antifungal Activities of a Novel Cationic Antimicrobial Peptide, Omiganan, in Experimental Skin Colonisation Models. *Int J Antimicrob Agents* 34(5): 457-461.
- Sandilands, A., O'Regan, G. M., Liao, H., Zhao, Y., Terron-Kwiatkowski, A., Watson, R. M., Cassidy, A. J., Goudie, D. R., Smith, F. J., McLean, W. H. und Irvine, A. D. (2006). Prevalent and Rare Mutations in the Gene Encoding Filaggrin Cause Ichthyosis Vulgaris and Predispose Individuals to Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol* 126(8): 1770-1775.
- Schmidt, A., Hansmann, B., Bartels, J., Schröder, J. (2012). Profilaggrin peptide fragments as contributors to the antimicrobial barrier of the skin [Abstract]. 39th Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Marburg. P023.
- Schröder, J. M. und Harder, J. (2006). Antimicrobial Skin Peptides and Proteins. *Cell Mol Life Sci* 63(4): 469-486.
- Schulz, C. F. (2010). Untersuchung Zur Rolle Der Profilaggrin-Peptide Flg₈₇₋₁₂₂ Und Flg₁₂₃₋₂₀₀ in Der Kutanen Abwehr [Dissertation]. Kiel: Christian-Albrechts-Universität.
- Singh, P. K., Tack, B. F., McCray, P. B., Jr. und Welsh, M. J. (2000). Synergistic and Additive Killing by Antimicrobial Factors Found in Human Airway Surface Liquid. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279(5): L799-805.
- Smith, E. L., Walworth, N. C. und Holick, M. F. (1986). Effect of 1 Alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 on the Morphologic and Biochemical Differentiation of Cultured Human Epidermal Keratinocytes Grown in Serum-Free Conditions. *J Invest Dermatol* 86(6): 709-714.
- Smith, F. J., Irvine, A. D., Terron-Kwiatkowski, A., Sandilands, A., Campbell, L. E., Zhao, Y., Liao, H., Evans, A. T., Goudie, D. R., Lewis-Jones, S., Arseculeratne, G., Munro, C. S., Sergeant, A., O'Regan, G., Bale, S. J., Compton, J. G., DiGiovanna, J. J., Presland, R. B., Fleckman, P. und McLean, W. H. (2006). Loss-of-Function Mutations in the Gene Encoding Filaggrin Cause Ichthyosis Vulgaris. *Nat Genet* 38(3): 337-342.
- Sorensen, O. E., Cowland, J. B., Theilgaard-Monch, K., Liu, L., Ganz, T. und Borregaard, N. (2003). Wound Healing and Expression of Antimicrobial Peptides/Polypeptides in Human Keratinocytes, a Consequence of Common Growth Factors. *J Immunol* 170(11): 5583-5589.
- Steinert, P. M., Cantieri, J. S., Teller, D. C., Lonsdale-Eccles, J. D. und Dale, B. A. (1981). Characterization of a Class of Cationic Proteins That Specifically Interact with Intermediate Filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(7): 4097-4101.
- Steven, A. C., Bisher, M. E., Roop, D. R. und Steinert, P. M. (1990). Biosynthetic Pathways of Filaggrin and Loricrin--Two Major Proteins Expressed by Terminally Differentiated Epidermal Keratinocytes. *J Struct Biol* 104(1-3): 150-162.

- Takaishi, M., Makino, T., Morohashi, M. und Huh, N. H. (2005). Identification of Human Hornerin and Its Expression in Regenerating and Psoriatic Skin. *J Biol Chem* 280(6): 4696-4703.
- Territo, M. C., Ganz, T., Selsted, M. E. und Lehrer, R. (1989). Monocyte-Chemotactic Activity of Defensins from Human Neutrophils. *J Clin Invest* 84(6): 2017-2020.
- Wu, Z., Hansmann, B., Meyer-Hoffert, U., Gläser, R. und Schröder, J. M. (2009). Molecular Identification and Expression Analysis of Filaggrin-2, a Member of the S100 Fused-Type Protein Family. *PLoS One* 4(4): e5227.
- Wu, Z., Latendorf, T., Meyer-Hoffert, U. und Schröder, J. M. (2011). Identification of Trichohyalin-Like 1, an S100 Fused-Type Protein Selectively Expressed in Hair Follicles. *J Invest Dermatol* 131(8): 1761-1763.
- Zaiou, M. (2007). Multifunctional Antimicrobial Peptides: Therapeutic Targets in Several Human Diseases. *J Mol Med (Berl)* 85(4): 317-329.
- Zakeri, B. und Lu, T. K. (2013). Synthetic Biology of Antimicrobial Discovery. *ACS Synth Biol* 2(7): 358-372.
- Zasloff, M. (1987). Magainins, a Class of Antimicrobial Peptides from *Xenopus* Skin: Isolation, Characterization of Two Active Forms, and Partial Cdna Sequence of a Precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(15): 5449-5453.

8 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. rer. nat. J.-M. Schröder, für die Überlassung des Themas dieser Dissertation und die großartige Betreuung bedanken.

Ein großer Dank geht auch an das gesamte Team des Labors der Hautklinik. Danke an Britta, Claudia, Jan, Joachim, Jutta, Ties und Uli. Es war immer eine sehr entspannte Atmosphäre und durch eure Unterstützung, war die Durchführung dieser Arbeit erst möglich. Die zahlreichen Stunden im Labor konnten durch euch, immer auch mit einem Lächeln absolviert werden. Außerdem danke ich allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern der Hautklinik.

Besonderer Dank geht auch an Britta, Claudia, Jan, Jutta und Ties, für die Hilfe bei der Durchführung der HPLC und der Bromcyan-Spaltung.

Ganz besonders möchte ich Dr. Britta Hansmann danken. Liebe Britta, mit deiner unermüdlichen Ruhe beim Erklären von physikalischen und chemischen Prinzipien und deiner tatkräftigen Unterstützung im Labor und beim Schreiben dieser Doktorarbeit, hast du einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Danke für die vielen Treffen, die zahlreichen Hilfestellungen und Ratschläge und natürlich auch für die lustigen Abende, die wir gemeinsam verbringen konnten.

Mein größter Dank geht an meine Familie. Meinen Eltern möchte ich an dieser Stelle für alles danken, was sie für mich getan haben. Sie haben mir das Medizinstudium ermöglicht und nicht zuletzt durch ihren Zuspruch und ihre Motivation konnte diese Arbeit entstehen. Ich danke euch beiden, für das beste Zuhause, das man sich nur wünschen kann und den Rückhalt den ihr mir jederzeit gebt!

Meinem großen Bruder Christian, möchte ich für die vielen Telefonate danken, in denen ich oft genug seinen Zuspruch brauchte. Vielen Dank für die Unterstützung!

9 Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Kristin Garske
Wohnort	Schützenwall 63 24114 Kiel
Geburtstag und -ort	29.09.1987 in Neuruppin
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch

Studium

2.-3.12. 2014	zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, mündlich-praktisch
7.-9.10. 2014	zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, schriftlich
08.2013 - 07.2014	praktisches Jahr
10.2010 - 07.2013	klinisches Studium an der Universität Kiel
08.2010	erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10.2008 - 08.2010	vorklinisches Studium an der Universität Kiel

Promotion

Beginn Mai 2012 bei Prof. Dr. rer. nat. Jens-M. Schröder
Leiter der Klinischen Forschergruppe "Mechanismen kutaner
Entzündungsreaktionen"
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
Thema: "Untersuchung zur Rolle der Filaggrin-Peptide
FLG₁₇₆₋₂₀₇, FLG₁₆₂₋₁₈₄ und FLG₁₆₂₋₂₀₇ in der kutanen Abwehr"

Freiwilliges soziales Jahr

2007-2008	ASB-Gesellschaft für soziale Einrichtungen mbH, Neuruppin
-----------	---

Schulbildung

2000 - 2007	Karl-Friedrich Schinkel Gymnasium, Neuruppin
1994 - 2000	Rosa Luxemburg Grundschule, Neuruppin

10 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich bisher an keiner anderen Stelle ein medizinisches oder zahnmedizinisches Promotionsverfahren beantragt oder mich einem solchen erfolglos unterzogen habe. Dies ist mein erster Promotionsversuch.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst habe und keine anderen als die von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen als Hilfen verwendet habe.

Kiel, den 10.09.2015

Kristin Garske

bisher erfolgte Veröffentlichungen:

K. Garske, B. Laudenbach, B. Hansmann, J. Bartels, J. M. Schröder, 2014. N-terminal profilaggrin peptide fragments as contributors to the antimicrobial barrier of the skin. 41th Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF). P046.